



Universidade Federal de Santa Catarina

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

**STELLA GOULART**

**Estudo do mecanismo da ação antiinflamatória de extratos de  
*Solidago chilensis* Meyen no modelo da pleurisia induzida por  
diferentes agentes flogísticos, em camundongos**

Florianópolis

2006



Universidade Federal de Santa Catarina

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

**STELLA GOULART**

**Estudo do mecanismo da ação antiinflamatória de extratos de  
*Solidago chilensis* Meyen no modelo da pleurisia induzida por  
diferentes agentes flogísticos, em camundongos**

*Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmácia, sob a orientação da Profa. Dra. Tânia Silvia Fröde.*

Florianópolis

2006

***“As pessoas sempre culpam as circunstâncias por aquilo que são. Eu não acredito em circunstâncias. Quem se sai bem nesse mundo são as pessoas que saem à procura das circunstâncias que desejam e se não as encontram, criam-nas.”***

***George Bernard Shaw***

***A meus pais, José e Maria Salete, por todo incentivo, carinho, preocupação e apoio tão essenciais.***

***Aos meus irmãos e amigos, pelos momentos de alegria, companheirismo e compreensão.***

***A professora Tânia pela sua dedicação, paciência, disponibilidade e amizade.***

## AGRADECIMENTOS

*A Deus, ser de infinita sabedoria, por dar-me força e saúde para superar e enfrentar tantos obstáculos ao longo desses dois anos, fazendo-me acreditar que tudo é possível, basta ter persistência e vontade de vencer.*

*Deixo aqui registrado o meu sincero agradecimento aos meus pais, José e Maria Salete, pois sem o auxílio e a dedicação de ambos, não teria galgado tantos degraus para atingir os meus objetivos. Agradeço também por toda a confiança depositada e por acreditarem que eu sou capaz de conquistar os meus sonhos.*

*Aos meus irmãos, Adriano e Giselle, aos meus cunhados, Ana Cristina e Robson, aos meus sobrinhos, Giulia, Giovana e César Augusto, por todos os momentos de alegria, ternura, apoio e intermináveis finais de semana.*

*Aos meus novos e mais do que especiais amigos, minha nova família: Silvana Vigil, Rafael, Jucélia, Ziliani, Robson, Vanessa, Silvana Zucolotto e Aerton, pelos momentos de descontração, pelo apoio e incentivo constantes, pelos muitos experimentos realizados juntos, pelos congressos, pelas festas, enfim, obrigada por serem meus amigos. Agradeço também a Ana Beatriz por toda a sua disposição em me ensinar o modelo experimental e pela sua amizade.*

*Agradeço a todos os meus amigos de infância, de graduação, de trabalho e de mestrado: Dianne, Douglas, Andréia, Ângela, Analice, Raquel, Eduardo, Ranilda e Wilma, que presentes ou não, sempre me auxiliaram e incentivaram de alguma maneira e, acreditaram na realização deste trabalho.*

*Um agradecimento, em especial, à professora Dra Tânia Silvia Fröde, a quem rendo minhas homenagens diante dos esforços, disposição e dos ensinamentos a mim transmitidos.*

*Ao professor Dr. Eloir Paulo Schenkel, à Karen Luise Lang e à Maria Izabel Goularte Moritz, pela produção dos extratos estudados e pelas importantes sugestões para a realização deste trabalho.*

*Aos funcionários do laboratório de análises clínicas do Hospital Universitário pelo auxílio e disposição na realização das técnicas.*

## AGRADECIMENTOS

---

*À Universidade Federal de Santa Catarina, aos professores, funcionários do Programa de Pós-graduação em Farmácia pela oportunidade de conviver e adquirir novos e importantes conhecimentos.*

*Enfim, a todos aqueles que de alguma maneira acreditaram na realização e no sucesso deste trabalho, a todos que a mim dedicaram seu tempo e esforço e a todos que fazem parte da minha vida.*

***Meus sinceros agradecimentos!***

## SUMÁRIO

	Pag.
LISTA DE ABREVIACÕES	7
LISTA DE FIGURAS	9
RESUMO	10
<i>ABSTRACT</i>	11
1. INTRODUÇÃO	12
1.1. PLANTAS MEDICINAIS	12
1.2. O GÊNERO <i>Solidago</i>	12
1.3. O PROCESSO INFLAMATÓRIO	14
1.4. MODELOS DE INFLAMAÇÃO	20
2. OBJETIVOS	22
2.1. OBJETIVO GERAL	22
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3. ARTIGO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO – Journal of Ethnopharmacology	23
4. DISCUSSÃO	53
5. CONCLUSÕES	62
6. PERSPECTIVAS	64
REFERÊNCIAS	65
ANEXO 1: Organogramas da triagem dos extratos e do mecanismo da ação antiinflamatória dos extratos e frações	77
ANEXO 2: Protocolo e cadastro da Comissão de Ética no Uso de Animais	79

### LISTA DE ABREVIações

A <sub>1</sub>	Receptor de adenosina tipo 1
A <sub>2A</sub>	Receptor de adenosina tipo 2A
A <sub>2B</sub>	Receptor de adenosina tipo 2B
A <sub>3</sub>	Receptor de adenosina tipo 3
ADA	Adenosina-deaminase
ADA-1	Adenosina-deaminase isoforma 1
ADA-2	Adenosina-deaminase isoforma 2
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
B <sub>1</sub>	Receptor da bradicinina tipo 1
B <sub>2</sub>	Receptor da bradicinina tipo 2
BK	Bradicinina
BuOH	Fração butanólica obtida do extrato aquoso das raízes de <i>Solidago chilensis</i>
cav.	Cavidade
CD99	Molécula de adesão expressa em células T
Cg	Carragenina
COX-1	Ciclooxigenase tipo 1
COX-2	Ciclooxigenase tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EA	Extrato aquoso liofilizado obtido das raízes de <i>Solidago chilensis</i>
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ELAM-1	Moléculas de adesão endotelial tipo 1
E-selectina	Molécula de adesão do tipo selectina, expressa em células endotelial
FR234938	Inibidor da enzima adenosina-deaminase
H <sub>1</sub>	Receptor da histamina tipo 1
H <sub>2</sub>	Receptor da histamina tipo 2
H <sub>3</sub>	Receptor da histamina tipo 3
H <sub>4</sub>	Receptor da histamina tipo 4
HIST	Histamina
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intrapleural
i.v.	Intravenoso
ICAM-1	Moléculas de adesão intracelular tipo 1
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL	Interleucina
IL-1 $\alpha$	Interleucina-1 alfa
IL-1Ra	Interleucina-1 Ra
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 beta
I- $\kappa$ B	Proteína inibidora do fator de transcrição nuclear NF-kappa B
J774	Linhagem celular de macrófagos de camundongos
LFA	Ácido lisofosfatídico
L-NAME	N <sup>G</sup> -nitro-L-arginina metil éster
LOX	Lipoxigenase
LPS	Lipopolissacarídeo
MPO	Mieloperoxidase
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
NF- $\kappa$ B	Fator de transcrição nuclear kappa B
NF-AT	Fator de transcrição nuclear de células T
NK <sub>1</sub>	Receptor das taquicininas tipo 1
NK <sub>2</sub>	Receptor das taquicininas tipo 2
NK <sub>3</sub>	Receptor das taquicininas tipo 3
NK <sub>4</sub>	Receptor das taquicininas tipo 4
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NOSe e NOS III	Óxido nítrico sintase constitutiva, expressa em células endoteliais
NOSi e NOS II	Óxido nítrico sintase induzida
NOSn e NOS I	Óxido nítrico sintase constitutiva, expressa em células neuronais



## LISTA DE ABREVIações

---

PMA	Acetato de forbol miristato
P-selectina	Molécula de adesão do tipo selectina, expressa em células epiteliais
R-954	Antagonista do receptor da bradicinina tipo 1
RA	Resíduo aquoso obtido do extrato aquoso das raízes de <i>Solidago chilensis</i>
RAW 264.7	Linhagem de macrófagos de camundongos
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensageiro
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SNC	Sistema nervoso central
SP	Substância P
SR140333	Antagonista do receptor das taquicininas tipo 1
SR142801	Antagonista do receptor das taquicininas tipo 3
SR48968	Antagonista do receptor das taquicininas tipo 2
TGF $\beta$	Fator de crescimento transformante do tipo beta
TH	Linfócito T auxiliar
TH1	Linfócito T auxiliar tipo 1
TH2	Linfócito T auxiliar tipo 2
TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TPA	(12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato)
U-937	Linhagem celular de monócitos humanos
VCAM-1	Moléculas de adesão vascular tipo 1
VCAM-2	Moléculas de adesão vascular tipo 2

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1	Folhas e flores de <i>Solidago chilensis</i> Meyen	13
Figura 2	Mecanismo da ação antiinflamatória proposto para o extrato aquoso das raízes de <i>Solidago chilensis</i> e suas frações: BuOH e RA	63

## RESUMO

**Estudo do mecanismo da ação antiinflamatória de extratos de *Solidago chilensis* Meyen no modelo da pleurisia induzida por diferentes agentes flogísticos, em camundongos.**

**Introdução:** A espécie *Solidago chilensis* Meyen, nativa da América do Sul e comumente conhecida como “arnica do Brasil”, tem demonstrado importante atividade antifúngica, antioxidante e antimicrobiana. No entanto, existem poucos estudos em relação a sua atividade antiinflamatória. **Objetivo:** O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito e o mecanismo de ação antiinflamatório dos extratos de *Solidago chilensis* Meyen, no modelo experimental da pleurisia, em camundongos. **Materiais e Métodos:** As raízes de *Solidago chilensis* foram coletadas em Caibi, Santa Catarina, Brasil, em Março de 2005. As raízes de *Solidago chilensis* foram secas à temperatura ambiente e protegidas da luz e do calor. Os extratos foram obtidos por infusão em água fervente por 10 min. Estes foram filtrados e liofilizados (E-C.Micromodulyo Freeze Dryer, USA). Duas frações (fração butanólica: BuOH e o resíduo aquoso: RA) foram obtidas a partir do extrato aquoso liofilizado que foi fracionado com acetato de etila e n-butanol. Todos os extratos foram administrados por via intraperitoneal (i.p.). Os animais utilizados para todos os experimentos foram camundongos albinos suíços, 2 meses de idade. A pleurisia foi induzida por uma injeção de 0,1 mL de diferentes agentes flogísticos: Cg (1%/cav.), BK (10 nmol/cav.), HIST (100 µg/cav.) ou SP (20 nmol/cav.) administrados por via intrapleural (i.pl.). A migração celular e a exsudação foram avaliadas 4 h após a administração do agente flogístico. Mieloperoxidase (MPO), adenosina-deaminase (ADA), óxido nítrico (NO), níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNFα) e interleucina-1 beta (IL-1β) foram avaliados somente no protocolo da pleurisia induzida pela carragenina. Para estudar a exsudação, um grupo de animais recebeu solução de azul de Evans (25 mg/kg, 0,2 mL), administrado por via intravenosa (i.v.), 1 h antes da indução da inflamação. A análise estatística entre os grupos foi determinada pelos testes ANOVA, Dunnett ou teste T de Student. Valores de P < 0.05 foram considerados significativos. **Resultados:** Na inflamação induzida pela carragenina, os extratos etanólicos e aquosos das raízes, folhas ou inflorescências inibiram os leucócitos e os neutrófilos (P < 0.05). Os extratos aquosos reduziram a exsudação (P < 0.05). O extrato aquoso das raízes (EA) e suas frações: fração butanólica (BuOH) e resíduo aquoso (RA) inibiram os leucócitos, os neutrófilos, os níveis de mieloperoxidase, adenosina-deaminase e TNFα induzida pela carragenina (Cg) (P < 0.05). EA e BuOH, mas não RA, inibiram a exsudação, os níveis de óxido nítrico e IL-1β (P < 0.05). Este extrato e suas frações também inibiram os leucócitos e os mononucleares na inflamação causada pela bradicinina (BK) (P < 0.01), os leucócitos totais e diferencial na inflamação induzida pela histamina (HIST) ou substância P (SP) (P < 0.05). EA, BuOH e RA não inibiram a exsudação causada por BK, HIST ou SP. A indometacina inibiu os leucócitos totais e diferencial na pleurisia induzida por Cg, BK, HIST ou SP e a exsudação, os níveis de mieloperoxidase, adenosina-deaminase, óxido nítrico e IL-1β na pleurisia induzida pela Cg (P < 0.05). **Conclusão:** Estes resultados demonstraram que a *Solidago chilensis* apresentou importante efeito antiinflamatório no modelo de inflamação aguda, em camundongos. As duas frações (butanólica e resíduo aquoso) das raízes de *Solidago chilensis* demonstraram ser efetivas na inibição dos parâmetros inflamatórios estudados, podendo ser futuramente utilizadas para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de doenças inflamatórias.

**Unitermos:** *Solidago chilensis*, inflamação, pleurisia, mediadores da inflamação, camundongos.

**ABSTRACT****Study of the mechanism of antiinflammatory action of *Solidago chilensis* extracts in the mouse model of pleurisy induced by different phlogogens.**

**Introduction:** The specie *Solidago chilensis* Meyen, native of South America and commonly known as “arnica of Brazil”, has demonstrated a important antifungal, antioxidant and antimicrobial properties. Otherwise, there are few studies in relation to its antiinflammatory activity. **Objective:** The aim of this study was to evaluate the effect, as well as, the mechanism of antiinflammatory action of extracts of *Solidago chilensis* Meyen in the mouse model of pleurisy induced by different phlogogens. **Material and methods:** The rhizomes of *Solidago chilensis* were collected in Caibi, Santa Catarina, Brazil, in March 2005. *Solidago chilensis* rhizomes were dried at room temperature and protected from light and heat. Extracts were obtained by infusion in boiling water for 10 min. It was filtered and lyophilized in an Edward® (E-C.Micromodulyo Freeze Dryer, USA). Subsequently, two fractions (butanolic fraction: BuOH and aqueous residue fraction: AR) were obtained from the aqueous lyophilized extract that was partitioned with ethyl acetate and n-butanol. All extracts were administrated by intraperitoneal route (i.p.). Non-fasted adult Swiss mice, aged 2 months, were used throughout the experiments. The pleurisy was induced by a single injection of 0.1 mL of different phlogistic agents: Cg (1%/cav.), BK (10 nmol/cav.), HIST (100 µg/cav.) or SP (20 nmol/cav.) administered by intrapleural route (i.pl.). Cell migration and exudation was evaluated 4 h after phlogogen administration. Myeloperoxidase (MPO), adenosine-deaminase (ADA), nitric oxide (NO), tumor necrosis factor alpha (TNFα) and interleukin-1 beta (IL-1β) levels were evaluated only in the protocols of carrageenan-induced pleurisy. To study the exudation, a group of animals received Evans blue dye (25 mg/kg, 0.2 mL), administered by intravenous route (i.v.), 1 h before the inflammation induction. Significant differences between groups were determined by analysis of variance (ANOVA), Dunnett’s or Student’s t tests. Values of P < 0.05 were considered significant. **Results:** In the inflammation induced by carrageenan the ethanolic and aqueous extracts of rhizomes, leaves or inflorescences inhibited leukocytes and neutrophils (P < 0.05). Only the aqueous extracts reduced exudate (P < 0.05). The rhizomes extract aqueous (AE) and their two fractions: butanolic fraction (BuOH) and aqueous residue (AR) inhibited leukocytes, neutrophils, myeloperoxidase, adenosine-deaminase and TNFα levels induced by carrageenan (Cg) (P < 0.05). AE and BuOH, but not AR, inhibited exudate, nitric oxide and IL-1β concentrations (P < 0.05). This extract and their two fractions also inhibited leukocytes and mononuclears in the inflammation caused by bradykinin (BK) (P < 0.01), total and differential leukocytes induced by histamine (HIS) or substance P (SP) (P < 0.05). AE, BuOH and AR did not inhibited the exudate caused by either BK, HIS or SP. Indomethacin, inhibited total and differential leukocytes in the pleurisy induced by Cg, BK, HIS and SP and exudation, myeloperoxidase, adenosine-deaminase, nitric oxide and IL-1β levels in the pleurisy induced by Cg (P < 0.05). **Conclusion:** These results demonstrated that *Solidago chilensis* has an important antiinflammatory effect in the acute mouse model of inflammation. The two fractions (butanolic and aqueous residue) from rhizomes of *Solidago chilensis* demonstrated important pharmacological activities that may be relevant potential new candidate drugs from plant sources to treat antiinflammatory disease.

**Keywords:** *Solidago chilensis*, inflammation, pleurisy, mediators of inflammation, mice.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. PLANTAS MEDICINAIS

O uso de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antigo quanto à civilização humana e por um longo período de tempo, minerais, produtos animais e plantas foram a principal fonte de moléculas biologicamente ativas (RATES, 2001; SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2003).

A biodiversidade da flora brasileira aliada ao seu vasto potencial terapêutico tem levado inúmeros pesquisadores a investigarem as propriedades químicas e biológicas de uma grande variedade de plantas utilizadas na medicina popular, bem como no sentido de dar uma base científica ao uso popular (SZELENYI; BRUME, 2002). Além disso, uma grande proporção da população tem acesso somente a preparações de origem vegetal para o tratamento de várias doenças.

Ao se considerar perspectiva de obtenção de novos fármacos, dois aspectos distinguem os produtos de origem natural dos sintéticos: a diversidade molecular e a função biológica. A diversidade molecular dos produtos naturais é muito superior àquela derivada dos processos de síntese, que apesar dos avanços consideráveis, ainda é limitada. No Brasil, estima-se que 25% dos US\$ 10 bilhões do faturamento da indústria farmacêutica nacional sejam originados de medicamentos derivados do reino vegetal. É importante ressaltar, que apenas 8% das espécies vegetais da flora brasileira foram estudadas em busca de compostos bioativos e somente 1.100 espécies vegetais foram estudadas em relação as suas propriedades medicinais (GUERRA; NODARI, 2003).

### 1.2. O GÊNERO *Solidago*

O gênero *Solidago* (Asteraceae) abrange cerca de 120 espécies nativas das Américas do Norte e do Sul, Europa e Ásia (WEYERSTAHL et al., 1993). A *Solidago chilensis* Meyen é uma espécie nativa da América do Sul, incluindo o sul e sudeste do Brasil, sendo conhecida na medicina popular como arnica, arnica-do-Brasil, arnica-brasileira, arnica silvestre, erva-lanceta, entre outros (SIMÕES et al., 1998). Estes nomes populares são aplicados pela similaridade de uso medicinal com a arnica-verdadeira, denominada *Arnica montana* L., nativa das regiões montanhosas da Europa, sendo de rara ocorrência no Brasil.

*Solidago chilensis* Meyen já é citada na Farmacopéia Brasileira de 1929, possui até 1,2 m de altura, é perene e pode se reproduzir por sementes e, principalmente, pelos rizomas. As folhas possuem forma de lança e as flores são de cor amarela (Figura 1). Esta espécie possui um crescimento vigoroso e persistente, por isso ocorre espontaneamente em terrenos baldios, beira de estradas e pastagens, sendo considerada planta daninha (LORENZI; MATOS, 2002).



Figura 1: Folhas e flores de *Solidago chilensis* Meyen  
Fonte: [http://www.geocities.com/riberan/FotosFlores/Solidago\\_chilensis](http://www.geocities.com/riberan/FotosFlores/Solidago_chilensis)

As espécies do gênero *Solidago* têm sido tradicionalmente utilizadas na medicina popular em vários países por mais de 700 anos, principalmente para o tratamento de infecções e/ou inflamações, como por exemplo, nefrite, cistite, litíase renal e reumatismo (HÄNSEL et al., 1994; BLUMENTHAL; BUSSE; GOLDBERG, 1998). Além disso, este gênero tem apresentado propriedades terapêuticas, dentre elas diurética e espasmolítica (BONGARTZ; HESSE, 1995; THIEM; GOSLINSKA, 2002).

*Solidago chilensis* Meyen é uma espécie considerada medicinal por suas propriedades anti-sépticas, analgésicas e cicatrizantes. Além disso, também tem sido observado efeito anti-hemorrágico, sendo também utilizada no tratamento de contusões, distensões e inflamações da pele (BORGES, 2001). Estudos realizados por Vila e colaboradores (2002) demonstraram ainda, que o óleo volátil extraído

desta espécie pode ser considerado um eficiente agente antifúngico contra os dermatófitos patogênicos ao homem.

No Paraguai, a utilização da *Solidago chilensis* na medicina popular data de 1710, pelo qual a decocção das inflorescências era utilizada com finalidades diurética e anti-helmíntica (SCHMEDA- HIRSCHMANN, 1987).

Investigações químicas com espécies do gênero *Solidago* demonstraram que, das partes aéreas foram isolados mono e sesquiterpenos (KREPINSKY; HEROUT, 1962; BOHLMANN et al., 1980), diterpenos (ANTHONSON et al., 1969; BOHLMANN et al., 1980), flavonóides (BATYUK; KOL'TSOVA, 1968; BATYUK; KOVALEVA, 1985), saponinas (REZNICEK; JURENITSCH; HASLINGER, 1989; REZNICEK et al., 1991) e poliacetilenos (LU et al., 1993).

Das raízes de *Solidago chilensis* já foram isolados diterpenos (solidagenona) (SCHMEDA-HIRSCHMANN, 1987) e esses apresentaram efeitos de proteção no modelo de lesão gástrica induzido pela solução ácido clorídrico e etanol, em camundongos (SCHMEDA-HIRSCHMANN; RODRIGUEZ; ASTUDILLO, 2002). Já das partes aéreas de *Solidago chilensis* foram isolados flavonóides glicosilados da família do canferol e, em maior quantidade, o flavonóide quercitrina (TORRES; AKISUE; ROQUE, 1987; GÜNTNER et al., 1999).

### 1.3. O PROCESSO INFLAMATÓRIO

A reação inflamatória é um evento complexo que envolve o reconhecimento do agente ou estímulo lesivo, para sua posterior destruição e formação de um novo tecido (SCHMID-SCHÖNBEIN, 2006). O reconhecimento desencadeia a ativação e a amplificação do sistema imune resultando na ativação de células e na liberação de diversos mediadores inflamatórios que são responsáveis pela vasodilatação, extravasamento do plasma e migração de leucócitos (CORSINI et al., 2005; SCHMID-SCHÖNBEIN, 2006).

O sistema fagocítico mononuclear é composto por dois tipos de células que participam na defesa imune do hospedeiro, desenvolvendo funções distintas: os macrófagos e os monócitos. Os macrófagos têm a função de remover antígenos particulados e atuar como células apresentadoras de antígeno, internalizando e apresentando antígenos aos linfócitos T (KIM; KIM; LEE, 2003). Os monócitos encontram-se circulando no sangue e, quando necessário, migram para diferentes

órgãos e cavidades do corpo em resposta a um estímulo lesivo, diferenciando-se em macrófagos.

Os leucócitos polimorfonucleares são as primeiras células que são ativadas na defesa imune do hospedeiro contra a infecção. Estas células migram e infiltram-se no sítio inflamatório por gradientes quimiotáticos, onde juntamente com os macrófagos, fagocitam e destroem o agente causador da inflamação (BIASI et al., 2003; ARNHOLD, 2004). A destruição do agente estranho ocorre por meio da liberação de enzimas hidrolíticas, proteínas bactericidas e espécies reativas de oxigênio (ROS) estocadas nos grânulos dos polimorfonucleares (ARNHOLD, 2004). Dentre estas enzimas, pode-se destacar a mieloperoxidase, uma protease presente nos grânulos azurófilos de neutrófilos e em monócitos (RODRIGUES et al., 2002; ARNHOLD, 2004; HANSSON; OLSSON; NAUSEEF, 2006).

A mieloperoxidase juntamente com o sistema nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase estão envolvidas na liberação de ROS. O NADPH oxidase reduz o oxigênio molecular ao radical ânion superóxido (ARNHOLD, 2004). A seguir, a enzima superóxido dismutase converte o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, o qual possui função de destruir bactérias diretamente ou após sua conversão em íons hidroxila ou ácido hipocloroso (ARNHOLD, 2004; KLEBANOFF, 2005). Além disso, o ácido hipocloroso é considerado um potente agente microbicida que possui papel importante na defesa do hospedeiro contra invasão de bactérias, fungos e vírus (NEVE; PARIJ; MOGUILEVSKY, 2001; HANSSON; OLSSON; NAUSEEF, 2006). Contudo, o aumento dos níveis de polimorfonucleares ativados em tecidos e a liberação excessiva dessas espécies reativas podem promover lesão tecidual e vascular, especialmente se estes neutrófilos ativados estiverem aderidos às células endoteliais (REYNOLDS; STEGEMAN; TERVAERT, 2002; HANSSON; OLSSON; NAUSEEF, 2006).

Outra enzima importante que está envolvida na resposta inflamatória é a adenosina-deaminase. Esta enzima é liberada principalmente por linfócitos ativados (GINES et al., 2002) e também possui um papel importante na maturação e na ativação de monócitos e linfócitos (ALDRICH et al., 2003).

A adenosina-deaminase participa do metabolismo das purinas catalisando irreversivelmente a deaminação da desoxiadenosina e adenosina em desoxinosina e inosina, respectivamente. A atividade desta enzima ocorre por meio da ação das isoenzimas denominadas ADA-1 e ADA-2 (NAKAMACHI et al., 2003).



As respostas biológicas para esta enzima são mediadas por quatro receptores distintos (A1, A2A, A2B e A3) e a estimulação de cada receptor induz a uma resposta funcional distinta, podendo ser uma ação pró ou antiinflamatória (LIVINGSTON; HEANEY; ENNIS, 2004; YOUNG et al., 2004; SPICUZZA; DI MARIA; POLOSA, 2006). O fato de receptores de adenosina estarem presentes em muitos tipos de células envolvidas na inflamação das vias aéreas deixa claro o envolvimento desta enzima na resposta inflamatória da asma e em outras doenças inflamatórias pulmonares (SPICUZZA; DI MARIA; POLOSA, 2006).

Nas fases iniciais do processo inflamatório, além da migração de leucócitos e da liberação dos seus mediadores químicos, também ocorre a vasodilatação induzida por diferentes agentes flogísticos (bradicinina, histamina, substância P) e pelo óxido nítrico (WOTHERSPOON et al., 2005; YOUSIF, 2005; CHEN et al., 2006). O óxido nítrico (NO) é um gás solúvel derivado do metabolismo da L-arginina pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS). O óxido nítrico tem uma função importante na sinalização celular e está envolvido no relaxamento vascular, na modulação da agregação plaquetária e na inibição da adesão leucocitária (TAKEUCHI et al., 2004). Outros efeitos deletérios do óxido nítrico são decorrentes da sua interação com ROS, formando outras espécies reativas de nitrogênio (RNS). Desta forma, quando células e tecidos são expostos a um estresse oxidativo induzido por poluentes ambientais, infecções, reações inflamatórias ou diminuição nos níveis de antioxidantes, o aumento nos níveis de ROS e RNS pode induzir diversas doenças, como câncer, aterosclerose e doenças neuro-degenerativas (RICCIARDOLO et al., 2004; DAI et al., 2006). Estas espécies são capazes de lesar o ácido desoxirribonucléico (DNA), os lipídeos microbianos e as células vizinhas saudáveis, sendo esse o mecanismo responsável pela maioria dos processos inflamatórios observados em doenças auto-imunes (RICCIARDOLO et al., 2004; MENEGAZZI et al., 2006).

A óxido nítrico sintase (NOS) existe em três isoformas distintas: NOS neuronal (NOS<sub>n</sub> ou NOS I), NOS endotelial (NOS<sub>e</sub> ou NOS III), ambas formas são constitutivas e estão localizadas no tecido nervoso central e nas células endoteliais, respectivamente. A NOS induzida (NOS<sub>i</sub> ou NOS II) é ativada em resposta a estímulos inflamatórios, como por mediadores endógenos: quemocinas e citocinas pró-inflamatórias (interleucina-1 beta: IL-1 $\beta$ , fator de necrose tumoral alfa: TNF $\alpha$ , interferon gama: IFN- $\gamma$ , etc.), bem como por fatores exógenos: endotoxinas

bacterianas, infecções virais, poluentes ambientais (estresse oxidativo), hipóxia, tumores, alérgenos, entre outros (RICCIARDOLO et al., 2004; BOVE; VLIET, 2006). Após estimulação, a NOSi libera grandes quantidades de NO em minutos, podendo até mesmo, manter essa liberação por horas ou dias (RICCIARDOLO, 2003).

A expressão de NOSi nas reações inflamatórias é encontrada predominantemente em células epiteliais (HEMMRICH et al., 2005), mas também em macrófagos (MUHL; DINARELLO, 1997), neutrófilos (EISERICH et al., 1998), mononucleares (ROUZAUT et al., 1999), eosinófilos (FERREIRA et al., 2002a) e células da musculatura lisa vascular (CHAN; FISCUS, 2004).

Além do óxido nítrico, outros mediadores que participam do processo inflamatório são as citocinas. Estas também estão envolvidas no crescimento, diferenciação e ativação celular, na imunidade e no reparo tecidual, além de outras funções (BUDHU; WANG, 2006). Diversos são os estímulos para a liberação das citocinas, incluindo infecção bacteriana, viroses, parasitoses, micoses, tumores, traumas, estímulos físicos (queimaduras, irradiações), necrose tecidual (infarto), respostas imunológicas (doença auto-imune) (BUDHU; WANG, 2006), entre outros.

Dentre as células que produzem citocinas destacam-se os linfócitos T auxiliares (TH) que são divididos em duas subpopulações, TH1 e TH2. As células TH1 secretam principalmente IFN- $\gamma$  e TNF $\alpha$ , enquanto as células TH2 liberam interleucinas: IL-4, IL-5 e IL-13 (NGOC et al., 2005). As células do tipo TH1 estão envolvidas em processos inflamatórios, enquanto as do tipo TH2 regulam principalmente a ativação de eosinófilos e a produção de imunoglobulinas E, que são importantes na inflamação alérgica (NGOC et al., 2005).

De forma geral, as citocinas são classificadas em subgrupos, como: interleucinas, fatores de necrose tumoral, fatores de crescimento, quemocinas, interferons e fatores estimuladores de colônia ou ainda, podem ser classificadas conforme sua atividade biológica como por exemplo: pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ , fator de crescimento transformante do tipo beta: TGF $\beta$ ) e antiinflamatórias (interleucina-1 Ra: IL-1Ra, IL-4, IL-10, IL-13) (WONG; FISH, 2003). Um balanço inadequado entre citocinas pró e antiinflamatórias durante uma resposta imune é crítico na resolução, ou não, da inflamação local (CORSINI et al., 2005).

Dentre as principais citocinas que possuem efeitos pró-inflamatórios destacam-se o  $\text{TNF}\alpha$  e a  $\text{IL-1}\beta$ . O  $\text{TNF}\alpha$  é uma citocina envolvida na patogênese das doenças inflamatórias crônicas, pois regula o crescimento, a proliferação, a diferenciação e a viabilidade de leucócitos ativados. O  $\text{TNF}\alpha$  também estimula a liberação celular de outras citocinas, quimocinas ou mediadores inflamatórios que exibem efeitos antivirais e antimicrobianos (NAIR et al., 2006). A  $\text{IL-1}\beta$  é produzida e secretada em diversas doenças inflamatórias e que estão associadas com a dor e a hiperalgesia, como por exemplo, nas neuropatias, nos tumores e nas doenças inflamatórias crônicas (artrite reumatóide) (SOMMER; KRESS, 2004).

O processo inflamatório nas vias aéreas é acompanhado por liberação de  $\text{TNF}\alpha$  e  $\text{IL-1}\beta$ . Estas citocinas agem sinergicamente amplificando a resposta inflamatória pulmonar estimulando a liberação de fatores quimioatraentes de macrófagos alveolares e de células epiteliais das vias aéreas, além de induzirem a expressão de moléculas de adesão em eosinófilos, neutrófilos e células endoteliais. Desta forma, estas citocinas são consideradas potentes indutoras do recrutamento de leucócitos (PETTERSEN; ADLER, 2002; ALBA-LOUREIRO et al., 2004). Uma diminuição na produção destas citocinas pode comprometer o desenvolvimento da resposta de defesa contra patógenos bacterianos e virais (CORSINI et al., 2005).

Outro mediador envolvido na resposta inflamatória e considerado um potente vasodilatador é a histamina. Esta é uma amina vasoativa, sintetizada a partir da histidina pela ação da histidina descarboxilase e armazenada dentro de grânulos secretores nos mastócitos e nos basófilos (MARONE et al., 2003). Em humanos, a histamina está armazenada em mastócitos e basófilos, células enterocromafins do trato gastrointestinal e nervos histaminérgicos no SNC. Além disso, tem se observado também a presença de histamina em linfócitos, monócitos e plaquetas humanas (MacGLASHAN, 2003).

Já foram identificados quatro subtipos de receptores histaminérgicos:  $\text{H}_1$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{H}_3$  e  $\text{H}_4$ . A ativação do receptor  $\text{H}_1$  está envolvida em eventos intracelulares caracterizados pelo aumento dos níveis de cálcio intracelular promovendo, por exemplo, a contração do músculo liso das vias aéreas, em humanos (KAWANO et al., 2004). Já a ativação do receptor  $\text{H}_2$  promove uma resposta intracelular caracterizada pela elevação dos níveis de adenosina monofosfato cíclica (AMPc) em células de linhagem celular de monócitos humanos: U-937 (DELGADO; FUENTES; FERNÁNDEZ-ALFONSO, 2003). A ativação deste receptor promove ainda a

secreção de ácido gástrico em animais e em humanos (BAROCELLI; BALLABENI, 2003). A ativação dos receptores  $H_3$  e  $H_4$  também está relacionada ao aumento do cálcio e do AMPc intracelular (MacGLASHAN, 2003).

Os basófilos e os mastócitos humanos podem ser estimulados a liberar histamina. Basófilos podem ser encontrados no sítio da inflamação durante reações de hipersensibilidade tardia, bem como na asma brônquica humana. Isto sugere que a histamina é liberada localmente por mastócitos e basófilos infiltrados, sendo um importante mediador endógeno na inflamação alérgica (MARONE et al., 2003).

A bradicinina, outro mediador da inflamação, é uma cinina formada a partir dos cininogênios,  $\alpha_2$ -globulinas de alto e baixo pesos moleculares, ambas derivadas de um único gene (BLAIS et al., 2000) por ação de cininogenases. Este mediador é um potente peptídeo pró-inflamatório sintetizado no local da inflamação, promovendo contração da musculatura lisa, aumento da permeabilidade vascular, extravasamento de plasma, infiltração de células inflamatórias e aumento na secreção de muco (GAMA LANDGRAF et al., 2004; ABRAHAM; SCURI; FARMER, 2006).

Regoli e Barabe propuseram em 1980, através de ensaios biológicos, a classificação de receptores da bradicinina em  $B_1$  e  $B_2$ . Atualmente estudos avaliaram a expressão dos receptores  $B_1$  e  $B_2$  na inflamação das vias aéreas (ZHANG; ADNER; CARDELL, 2005; ABRAHAM; SCURI; FARMER, 2006).

O receptor  $B_2$  é expresso constitutivamente em diversos tecidos do organismo, incluindo o sistema nervoso central (SNC) de animais de várias espécies (FERREIRA et al., 2002b). A ativação destes receptores promove a maioria dos efeitos fisiológicos da bradicinina, como broncoconstrição, hipotensão, reação inflamatória aguda, formação de edema, dor e hiperalgesia via estimulação das fibras C (ABRAHAM; SCURI; FARMER, 2006). Já o receptor  $B_1$  geralmente é expresso em condições patológicas através de estímulos inflamatórios, como lipopolissacarídeos e citocinas (IL- $1\beta$ , IL-6 e TNF $\alpha$ ) (GAMA LANDGRAF et al., 2004; MEDEIROS et al., 2004). Os principais efeitos da ativação dos receptores  $B_1$  incluem vasodilatação, extravasamento de plasma, hiperalgesia, ativação e migração de leucócitos (ABRAHAM; SCURI; FARMER, 2006). Desta forma, os efeitos da bradicinina podem ser mediados diretamente pela ativação dos seus receptores (GAMA LANDGRAF et al., 2004).

Outros importantes mediadores pró-inflamatórios relacionados a dor são as taquicinininas, pertencentes a uma família de pequenos peptídeos liberados tanto em nível de SNC como no sistema nervoso periférico (LIU; BURCHER, 2005). Cinco peptídeos desta família têm sido identificados em mamíferos: a neurocinina A, a neurocinina B, a substância P, o neuropeptídeo  $\gamma$  e o neuropeptídeo K (O'CONNOR et al., 2004).

Dentre os principais efeitos biológicos destes peptídeos destacam-se: vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, extravasamento plasmático, quimiotaxia de neutrófilos, contração da musculatura lisa, secreção de muco e ativação das fibras nervosas sensoriais (CIRINO; FIORUCCI; SESSA, 2003). Estes peptídeos também estão envolvidos em processos imunológicos, inflamatórios e na inflamação neurogênica através da liberação de citocinas (HARRISON; GEPPETTI, 2001; PENNEFATHER et al., 2004; LIU; BURCHER, 2005).

Os efeitos das taquicinininas são mediados pela ativação de três receptores taquicinérgicos específicos: NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> e NK<sub>3</sub> e estes são ativados preferencialmente pela substância P, neurocinina A e neurocinina B, respectivamente (O'CONNOR et al., 2004). Recentemente estudos demonstraram a presença de um quarto receptor para as taquicinininas, o NK<sub>4</sub> (DONALDSON; HASKELL; HANLEY, 2001).

Estudos demonstraram que a substância P participa no processo inflamatório em diversas doenças dos sistemas respiratório, gastrointestinal e músculo-esquelético. Isto se deve ao fato desta substância possuir efeitos pró-inflamatórios e ser secretada por diferentes tipos celulares, como macrófagos, eosinófilos, linfócitos, células dendríticas e neurônios (O'CONNOR et al., 2004).

#### **1.4. MODELOS DE INFLAMAÇÃO**

Dentre os modelos experimentais para o estudo do processo inflamatório e para a triagem de novos fármacos, citam-se: pleurisia, indução de edema de pata, bolsa de ar, artrite e implantes de esponjas embebidas com agentes irritantes no subcutâneo (SEDGWICK; WILLOUGHBY, 1985).

O modelo da pleurisia é caracterizado por um aumento da exsudação e uma infiltração imediata por neutrófilos que ocorre 4 h após a administração do agente flogístico carragenina na cavidade pleural de camundongos. Nesta fase inicial da inflamação ocorre, ainda, a liberação de histamina, 5-hidroxitriptamina, bradicinina e liberação de espécies reativas de oxigênio pelos neutrófilos, como peróxido de

hidrogênio, aniôn superóxido e radicais hidroxilas, bem como a liberação de outros mediadores (CORSINI et al., 2005). 48 h após, ocorre aumento também da exsudação e infiltrado de células do tipo mononucleares (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996). Nesta fase tardia participam, principalmente, prostaglandinas e citocinas pró-inflamatórias (CORSINI et al., 2005).

Desta forma, o modelo da pleurisia é útil para se estudar a inflamação propriamente dita, e também, fármacos ou produtos naturais que possuem propriedades antiinflamatórias.

A técnica de pleurisia possui vantagens em relação às outras técnicas, pois a partir da coleta dos lavados da cavidade pleural é possível analisar e quantificar diversos parâmetros inflamatórios como celularidade, exsudação, mediadores pró-inflamatórios (citocinas, óxido nítrico, entre outros), além da participação de enzimas como mieloperoxidase e adenosina-deaminase, sem necessitar recorrer a procedimentos complicados de extração e quantificação. Uma outra vantagem adicional em relação aos modelos citados é a sua fácil execução, pois diferentes agentes flogísticos (específicos e não específicos) podem ser estudados.

Neste trabalho, optou-se pelo modelo experimental da pleurisia. A escolha deste modelo foi baseada em evidências já comentadas acima, destacando sua utilidade, servindo para o estudo da reação inflamatória, bem como avaliação dos extratos vegetais com potencial propriedades antiinflamatórias. Como citado, o volume de fluido extravasado, o acúmulo de células e os mediadores químicos que participam da reação podem ser quali e quantitativamente analisados.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Estudar o efeito e o mecanismo da ação antiinflamatória de extratos de *Solidago chilensis* Meyen no modelo experimental da pleurisia, em camundongos.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Realizar triagem dos extratos etanólicos e aquosos obtidos das raízes, folhas e inflorescências de *Solidago chilensis*, avaliando-se o perfil de atividade antiinflamatória no modelo da pleurisia induzida pela carragenina (Anexo 1);
- ✓ Estudar o mecanismo da ação antiinflamatória dos extratos que apresentarem melhores resultados na triagem, bem como das frações obtidas de seu fracionamento, analisando-se o efeito destes sobre os parâmetros inflamatórios: leucócitos, exsudação, atividade da mieloperoxidase (MPO) e da adenosina-deaminase (ADA), níveis de nitrato/nitrito (NO), fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ), no modelo da pleurisia induzida pela carragenina (Anexo 1);
- ✓ Verificar se o extrato escolhido e suas frações inibem outros mediadores da inflamação (bradicinina, histamina e substância P), estudando-se o efeito destes sobre a migração dos leucócitos e exsudação na inflamação induzida por estes agentes flogísticos (Anexo 1).

### 3. ARTIGO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO

#### Antiinflammatory evaluation of *Solidago chilensis*

Stella Goulart<sup>a</sup>, Maria Izabel Goularte Moritz<sup>b</sup>, Eloir Paulo Schenkel<sup>b</sup> and Tânia Silvia Fröde<sup>a\*</sup>

*Journal of Ethnopharmacology*

Impact factor: 1.554  
Qualis: A

**Short title:** Antiinflammatory effects of *Solidago chilensis*

<sup>a</sup>Department of Clinical Analysis, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Catarina, Campus Universitário - Trindade, 88040-970, Florianópolis, SC, Brazil.

<sup>b</sup>Department of Pharmaceutical Science, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Catarina, Campus Universitário - Trindade, 88040-970, Florianópolis, SC, Brazil.

**\* Corresponding author: Phone: +55 48 99614846, FAX: +55 48 32440936.**

e-mail address: [saleh@ccs.ufsc.br](mailto:saleh@ccs.ufsc.br) or [taniafrode@zipmail.com.br](mailto:taniafrode@zipmail.com.br) (T. S. Fröde).



## Abstract

The aim of this study was: 1) To study and elucidate the antiinflammatory effect of several extracts and their fractions of *Solidago chilensis* administered by intraperitoneal route on the pleurisy in mice. **Results:** The ethanolic and aqueous extracts of rhizomes, leaves or inflorescences inhibited leukocytes and neutrophils ( $P < 0.05$ ) in the inflammation induced by carrageenan. Only the aqueous extracts reduced exudate ( $P < 0.05$ ). The rhizomes extract aqueous (AE) and their two fractions: butanolic fraction (BuOH) and aqueous residue (AR) inhibited leukocytes, neutrophils, myeloperoxidase, adenosine-deaminase and  $\text{TNF}\alpha$  induced by carrageenan (Cg) ( $P < 0.05$ ). AE and BuOH, but not AR, inhibited exudate, nitric oxide and  $\text{IL-1}\beta$  levels ( $P < 0.05$ ). This extract and their two fractions inhibited leukocytes and mononuclears in the inflammation caused by bradykinin (BK) ( $P < 0.01$ ) and AR also inhibited neutrophils ( $P < 0.05$ ), total and differential leukocytes induced by histamine (HIS) or substance P (SP) ( $P < 0.05$ ). AE, BuOH and AR did not inhibited the exudate caused by either BK, HIS or SP. **Conclusion:** *Solidago chilensis* ethanolic and aqueous extracts have an important anti-inflammatory effect, inhibiting cells in the inflammation caused by carrageenan. In addition, the rhizomes aqueous extract and its derived fractions also decreased the pro-inflammatory mediators release into the site of the inflammatory process. The rhizomes aqueous extract and the butanolic fraction showed more evident anti-inflammatory actions.

Keywords: *Solidago chilensis*; Inflammation; Pleurisy; Mediators of inflammation; Mice.

## 1. Introduction

The large genus *Solidago* is placed in the family Asteraceae, comprising about 120 species natives of the North and South America, Europe and Asia (Weyerstahl et al., 1993). In Brazil there is a diverse flora of *Solidago chilensis* Meyen, commonly known as erva-lanceta, but it can also be referred to as “arnica”, “arnica-brasileira”, “arnica-do-campo”, “arnica-silvestre”, a denomination derived from its usage as a substitute for *Arnica montana*. *Solidago chilensis* is native of South America and is present at Brazilian Pharmacopoeia (Brazilian Pharmacopoeia, 1929).

*Solidago* species have been used in popular medicine in several countries for the treatment of several conditions of infection and inflammation (Apáti et al., 2003). In Brazil, *Solidago chilensis* has ethnomedical application due to its important antifungal, antioxidant and antimicrobial properties (Güntner et al., 1999; Duarte et al., 2005; Morel et al., 2006).

Previous chemical investigations in a species of genus *Solidago* resulted in the isolation of mono and sesquiterpenes (Bohlmann et al., 1980), diterpenes (Bohlmann et al., 1980; Lu et al., 1993), flavonoids (Batyuk and Kovaleva, 1985), saponins (Reznicek et al., 1991) and polyacetylenes (Lu et al., 1993). Investigations of the rhizomes of *Solidago chilensis* reported in the isolation of components as the labdane diterpene (solidagenone) (Schmeda-Hirschmann, 1987), showed to display gastroprotective effect (Schmeda-Hirschmann et al., 2002). Since of the aerial parts of *Solidago chilensis* resulted in the isolation of glycosilated flavonoids quercetrin (Güntner et al., 1999).

In this work, the aim were: 1) To screen approach of the ethanolic and aqueous extracts obtained from rhizomes, leaves and inflorescences of *Solidago chilensis* Meyen to identifying potential antiinflammatory properties, in the mouse model of

pleurisy, 2) To elucidate the antiinflammatory effect of the extract that was more effective in exhibiting the antiinflammatory activity, included their fractions, observing its effect on leukocytes, exudation, myeloperoxidase, adenosine-deaminase, nitric oxide,  $\text{TNF}\alpha$  and  $\text{IL-1}\beta$  levels in the mouse model of pleurisy induced by Cg, BK, HIS and SP.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant materials

Rhizomes, leaves, and inflorescences of *Solidago chilensis* Meyen were collected in Caibi, a city located in the State of Santa Catarina, Brazil. They were collected in March of 2005, and were identified by the botanist Prof. Dr. Daniel Falkenberg of the Department of Botany at the Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil, where the voucher specimen (FLOR 34673) currently deposited.

### 2.2. Preparation of the extracts and fractions

*Solidago chilensis* rhizomes, leaves or inflorescences were air-dried at room temperature for 7 days. To attain the ethanolic extracts, the dried and powdered rhizomes, leaves or inflorescences were macerated in hydrated ethanol 92,8° (plant: solvent, 1:10, w/v) for 7 days. Subsequently, the extracts were filtered and concentrated with a rotaevaporator apparatus. The yield were 10, 11 e 5%, respectively. To obtain the aqueous extracts, the powdered rhizomes, leaves or inflorescences were extracted using hot water at 90°C (plant: solvent, 1:10, w/v) under infusion during 10 min, yielding 12, 10 e 8% respectively. Thereafter, the extracts were filtered and an aliquot was lyophilized (Edward® E-C Micromodulyo

Freezer Dryer, USA). Part of the aqueous extract of the rhizomes was partitioned three times with 50 mL of n-BuOH, resulting in the butanolic fraction (yield 12,9%) and aqueous residual fraction (yield 87,1%). These fractions were evaporated under reduced pressure at temperature below 50° C, yielding dry residues, referred to in the present study as “butanolic fraction (BuOH)” and “aqueous residue fraction (AR)”.

### 2.3. *Animals*

Swiss mice, weighing 18-25 g, were housed under standardized conditions (room at constant temperature (25<sup>0</sup>C) with alternating 12-h periods of light and darkness), humidity of 50-60 %, and were fed a standard mouse diet with water *ad libitum* before use. This study was approved by the Committee for Ethics in Animal Research of our university and performed in accordance with norms of the Brazilian College of Animal Experimentation.

### 2.4. *Experimental protocol*

Pleurisy experiments were carried out as previously described (Saleh et al., 1996; 1997; Fröde-Saleh et al., 1999; Da Cunha et al., 2001) and different phlogistic agents were employed (carrageenan: Cg, bradykinin: BK, histamine: HIS and substance P: SP). Cell migration and exudation was evaluated 4 h after phlogogen administration. Myeloperoxidase (MPO), adenosine-deaminase (ADA), nitrate/nitrite concentrations (NO<sup>x</sup>), tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) and interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) levels were evaluated only in the protocols of carrageenan-induced pleurisy. In separate experimental protocols it was used the indomethacin (5 mg/kg), administered by intraperitoneal route (i.p.), 0.5 h before pleurisy induction, as a reference drug.

Samples of the fluid collected from the pleural cavity were stored in a freezer (-20°C) and determinations of the exudation (amount of Evans Blue dye) were made as scheduled on different days. Enzymes and cytokine assays were processed on the same day as the pleurisy protocols.

Initially we evaluated the effect of ethanolic and aqueous extracts obtained from rhizomes, leaves and inflorescences of *Solidago chilensis* on the mouse model of pleurisy induced by Cg. In this protocol, different groups of animals were treated (0.5 h before) with different doses (10-200 mg/kg) of these extracts administered by intraperitoneal route (i.p.). The inflammatory parameters (cell migration and exudation) were analyzed 4 h after. In this protocol we selected the rhizomes aqueous extract that showed the best antiinflammatory action by inhibiting leukocytes and/or exudation at lower doses than the other extracts. We also analyzed the antiinflammatory properties of the two fractions of the rhizomes aqueous extract: butanolic (BuOH) and aqueous residue (AR).

In another protocol to establish a standard the studied rhizomes aqueous extract (AE) and their two isolated fractions (BuOH, AR) dose and timing to be used in the experiments, different groups of animals were treated (0.5 h before) with different doses of butanolic or aqueous residue fractions at doses of 10-200 mg/kg, i.p. and the inflammatory parameters (cell migration and exudation) were analyzed 4 h after carrageenan injection. In another set of experiments, different groups of animals were pretreated with one dose of aqueous extract, butanolic fraction or aqueous residue at different time points (0.5-4 h) and the same inflammatory parameters were evaluated 4 h after pleurisy induction. According to this protocol, aqueous extract (25 mg/kg), butanolic fraction (25 mg/kg) or aqueous residue (50

mg/kg) administered 0.5 h before carrageenan induction were elected as the doses to be used in the experiments below.

In this protocol animals were randomly allocated in twenty one groups: 1) Control-treated with sterile saline (NaCl 0.9%, i.pl.), 2) Cg (1%, i.pl.), 3) Cg (1%, i.pl.) plus AE (10-200 mg/kg, i.p.), 4) Cg (1%, i.pl.) plus BuOH (10-200 mg/kg, i.p.), 5) Cg (1%, i.pl.) plus AR (10-200 mg/kg, i.p.), 6) Cg (1%, i.pl.) plus indomethacin (0.5 mg/kg, i.p.), 7) BK (10 nmol, i.pl.), 8) BK (10 nmol, i.pl.) plus AE (25 mg/kg, i.p.), 9) BK (10 nmol, i.pl.) plus BuOH (25 mg/kg, i.p.), 10) BK (10 nmol, i.pl.) plus AR (50 mg/kg, i.p.), 11) BK (10 nmol, i.pl.) plus indomethacin (0.5 mg/kg, i.p.), 12) HIS (100 µg, i.pl.), 13) HIS (100 µg, i.pl.) plus AE (25 mg/kg, i.p.), 14) HIS (100 µg, i.pl.) plus BuOH (25 mg/kg, i.p.), 15) HIS (100 µg, i.pl.) plus AE (50 mg/kg, i.p.), 16) HIS (100 µg, i.pl.) plus indomethacin (0.5 mg/kg, i.p.), 17) SP (20 nmol, i.pl.), 18) SP (20 nmol, i.pl.) plus AE (25 mg/kg, i.p.), 19) SP (20 nmol, i.pl.) plus BuOH (25 mg/kg, i.p.), 20) SP (20 nmol, i.pl.) plus AR (50 mg/kg, i.p.) and 21) SP (20 nmol, i.pl.) plus indomethacin (0.5 mg/kg, i.p.).

All extracts and indomethacin were administered 0.5 h prior to pleurisy induction.

In the pleurisy induced by bradykinin, the animals were also treated with captopril (5 mg/kg, i.p, 0.5 h before) to prevent the action of kininases (Campos and Calixto, 1995).

#### *2.4.1. Quantification of cell migration and exudation*

After killing the animals (4 h after pleurisy), samples of the pleural cavity fluid were collected for determinations of total and differential leukocyte contents and exudation. Total leukocyte counts were determined in a Neubauer chamber diluting

the exudates in Türk solution (1:20), and cytospin preparations of exudates were stained with May-Grünwald-Giemsa for the differential count, which was performed under an oil immersion objective.

The degree of exudation was determined by the measurement of the amount of Evans blue dye extravasation in the exudate as previously described (Saleh et al., 1996; 1997; Fröde-Saleh et al., 1999; Da Cunha et al., 2001). Thus, in each experimental group, animals were previously challenged (1 h) with a solution of Evans blue dye (25 mg/kg) administered by intravenous route (i.v.) in order to evaluate the degree of exudation in the pleural cavity. On the day of the experiments, a batch of stored samples was thawed at room temperature and the amount of dye was estimated by colorimetry using an Elisa plate reader (Organon Teknika, Roseland, New Jersey, USA) at 600 nm, by interpolation from a standard curve of Evans blue dye in the range of 0.01 to 50 µg/mL.

#### *2.4.2. Quantification of myeloperoxidase and adenosine-deaminase activities in carrageenan-induced pleurisy*

In-house assays of both MPO and ADA were employed according to the methods developed by Rao et al. (1993) and Giusti and Galanti (1984). Using conventional reagents, the concentration of each enzyme was estimated by means of colorimetric measurements (absorbances of 450 and 630 nm, respectively) in an ELISA plate reader (Organon Tecknica). Results were expressed as mU/ml (MPO) and U/l (ADA). Detailed descriptions of these assays have been previously published [Fröde and Medeiros, 2001].

#### 2.4.3. Quantification of nitrate/nitrite concentrations in carrageenan-induced pleurisy

Nitric oxide was measured as its breakdown products nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) and nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) using the Griess method (Di Rosa et al., 1996). Samples of the exudation obtained from control (treated with sterile saline), carrageenan-treated animals and animals pretreated with either extracts or indomethacin were collected, separated and stored at  $-20^\circ\text{C}$ . The levels of nitrate/nitrite were determined as previously described by Saleh et al. (1999). Results were expressed as  $\mu\text{M}$ .

#### 2.4.4. Quantification of $\text{TNF}\alpha$ and $\text{IL-1}\beta$ in carrageenan-induced pleurisy

Samples of the exudates obtained from control and carrageenan-treated animals, and animals pretreated with either extracts or indomethacin, were collected and immediately prepared for the analysis of cytokine levels. In this protocol, commercially available kits were used with monoclonal specific antibodies for each cytokine. The cytokine levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using Bioscience Pharmigen, USA (for  $\text{TNF}\alpha$ ) and Immuno Biological Laboratories Co. Ltda, Japan (for  $\text{IL-1}\beta$ ) kits according to the manufacturers instructions. The ranges of the values detected by these assays were:  $\text{TNF}\alpha$  (5 - 2000 pg/mL) and  $\text{IL-1}\beta$  (100 - 6400 pg/mL). The intra and interassay coefficients of variation (CV) for  $\text{TNF}\alpha$  and  $\text{IL-1}\beta$  were: intra CV:  $\text{TNF}\alpha = 7.8 \pm 0.9\%$  and  $\text{IL-1}\beta = 6.2 \pm 0.4\%$ ; inter CV:  $\text{TNF}\alpha = 9.6 \pm 2.1\%$  and  $\text{IL-1}\beta = 5.1 \pm 0.6\%$ , sensitivities of  $\text{TNF}\alpha = 5 \text{ pg/ml}$  and  $\text{IL-1}\beta = 1.67 \text{ pg/ml}$ . All cytokine concentrations were estimated by means of colorimetric measurement at 450 nm on an ELISA plate reader (Organon Teknika, Roseland, NJ, USA) by interpolation from a standard curve.



## 2.5. Drugs

The following drugs and reagents were used: carrageenan (degree IV), bradykinin, histamine, substance P, human neutrophil myeloperoxidase, indomethacin, diphenylboryloxyethylamina (Sigma Chemical Co., St. Luis, MO, USA), captopril (Ranbaxy Laboratories Limited Industrial, Dewas Madhya Pradesh, India), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for quantitative determination of mouse TNF $\alpha$  (BD - Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA) and rat IL-1 $\beta$  (IBL - Immuno Biological Laboratories Co. Ltd., Fujioka-city, Gunma, Japan). May-Grünwald dye (Newprov, Pinhais, PR, Brazil) and Giemsa dye (Laborclin, Pinhais, PR, Brazil). For chromatographic analysis, we used diphenylboryloxyethylamina as color reagent and aluminium sheets coated with silica gel GF 254 (Merk, Darmstadt, Germany). Other reagents used were of analytical grade and were obtained from different commercial sources.

## 2.6. Statistical analysis

Data are reported as mean  $\pm$  SEM. Significant differences between groups were determined by analysis of variance (ANOVA) complemented with Dunnett's and/or Student's t tests.  $P < 0.05$  was considered as indicative of significance.

## 3. Results

### 3.1. Pleurisy induced by carrageenan

#### 3.1.1. Screening of the extracts

The ethanolic extracts of the rhizomes, leaves and inflorescences of *Solidago chilensis* (100-200 mg/kg) were effective in inhibited leukocytes and neutrophils ( $P < 0.05$ ), but they failed to reduce exudation ( $P > 0.05$ ) (data not show). On the other

hand, the aqueous extracts (10-200 mg/kg) inhibited leukocytes, neutrophils and exudation ( $P < 0.05$ ) (results not shown).

Our results also showed that rhizomes aqueous extract inhibited antiinflammatory parameters (leukocytes and/or exudation) at lower doses (25 mg/kg) than leaves or inflorescences (50 mg/kg) ( $P < 0.05$ ) (results not shown). By this fact the following experiments were realized using rhizomes aqueous extract and their two fractions (butanolic and aqueous residue) for investigate other inflammatory parameters.

### *3.1.2. Effects of rhizomes extracts of *Solidago chilensis* and indomethacin on cellular migration and exudation*

The rhizomes aqueous extract of *Solidago chilensis* (10 to 200 mg/kg) significantly decreased the leukocyte migration by  $31 \pm 6$  to  $77 \pm 4$  % ( $P < 0.01$ ) (Fig. 1A), due to neutrophils inhibition by  $32 \pm 11$  to  $99 \pm 1$  % ( $P < 0.05$ ) (Fig. 1B). Furthermore, this extract at dose of 200 mg/kg produced a significant increase of mononuclears by  $53 \pm 25$  % ( $P < 0.05$ ) (Fig. 1C). Under the same experimental conditions, aqueous extract (25 to 200 mg/kg) were able to reduce the exudate by  $24 \pm 5$  to  $40 \pm 4$  % ( $P < 0.05$ ) (Fig. 1D) in the inflammation induced by carrageenan.

The analysis of the two fractions from rhizomes aqueous extract revealed that the butanolic fraction (25 to 200 mg/kg) were effective in inhibiting leukocyte migration by  $72 \pm 1$  to  $76 \pm 2$  % ( $P < 0.01$ ) (Fig. 2A), due to neutrophils inhibition by  $93 \pm 1$  to  $98 \pm 1$  % ( $P < 0.01$ ) (Fig. 2B). The butanolic fraction did not change mononuclear cells ( $P > 0.05$ ) (Fig. 2C) and the exudation was inhibited only at dose of 50 mg/kg by  $19 \pm 2$  % ( $P < 0.05$ ) (Fig. 2D). The butanolic fraction (10 mg/kg) did not vary any the studied inflammatory parameters.

The aqueous residue (50 to 200 mg/kg) produced a significant decrease of leukocyte by  $48 \pm 3$  to  $67 \pm 3$  % ( $P < 0.01$ ) (Fig. 3A), via inhibition of neutrophils by  $63 \pm 8$  to  $79 \pm 11$  % ( $P < 0.01$ ) (Fig. 3B). In addition, the aqueous residue failed to reduce the mononuclear cells and exudation ( $P > 0.05$ ) (Figs. 3C and 3D). The doses of 10 and 25 mg/kg of aqueous residue did not modify the studied parameters.

The time course profile analysis for rhizomes aqueous extract and two fractions of *Solidago chilensis* demonstrated that only the pretreatment of 0.5 h was effective in inhibiting the inflammatory parameters studied (results not shown).

The curve dose-response and time course profile studied indicated that the inhibitory effects of the aqueous extract, butanolic fraction or aqueous residue observed upon leukocyte migration or exudate were optimal in animals injected 0.5 h earlier with 25 mg/kg to AE and BuOH or 50 mg/kg to AR. For this reason these doses and pre-treatment time were chosen for other experiments.

As expected, the indomethacin (cyclooxygenase inhibitor, 5 mg/kg), administered 0.5 h before, caused a significant inhibition of leukocyte migration by  $63 \pm 5$  % ( $P < 0.01$ ), neutrophils by  $64 \pm 5$  % ( $P < 0.01$ ), mononuclear cells by  $66 \pm 11$  % ( $P < 0.05$ ) and exudation by  $31 \pm 5$  % ( $P < 0.01$ ) in the mouse model pleurisy induced by carrageenan (Figs. 1, 2 and 3).

### 3.1.3. Effects of rhizomes extracts of *Solidago chilensis* and indomethacin on myeloperoxidase, adenosine-deaminase activities and nitrate/nitrite levels

The pretreatment (0.5 h) of animals with rhizomes aqueous extract and their two fractions caused a marked reduction in myeloperoxidase (% of inhibition: AE:  $35 \pm 7$ ; BuOH:  $33 \pm 7$  and AR:  $63 \pm 10$ ) ( $P < 0.01$ ) (Fig. 4A) and adenosine-deaminase activities (% of inhibition: AE:  $56 \pm 6$ ; BuOH:  $27 \pm 10$  and AR:  $42 \pm 8$ ) ( $P < 0.01$ ) (Fig.

4B). Under the same conditions, the aqueous extract and butanolic fraction decreased the nitrate/nitrite concentrations (% of inhibition: AE:  $48 \pm 5$  and BuOH:  $60 \pm 5$ ) ( $P < 0.01$ ) (Fig. 4C). The aqueous residue was ineffective in inhibiting nitrate/nitrite levels ( $P > 0.05$ ) (Fig. 4C).

The indomethacin pretreatment presented an inhibitory effect on myeloperoxidase by  $39 \pm 7$  %, adenosine-deaminase activities by  $65 \pm 2$  % and nitrate/nitrite levels by  $56 \pm 8$  % ( $P < 0.01$ ) (Figs. 4A, 4B and 4C).

#### *3.1.4. Effects of rhizomes extracts of Solidago chilensis and indomethacin on cytokine levels*

The rhizomes aqueous extract and two fractions studied was also effective in inhibiting  $\text{TNF}\alpha$  levels (% of inhibition: AE:  $72 \pm 8$ ; BuOH:  $70 \pm 9$  and AR:  $72 \pm 12$ ) ( $P < 0.05$ ) (Fig. 5A). In addition, the aqueous extract and butanolic fraction at dose of 25 mg/kg, but not aqueous residue (50 mg/kg), showed a small reduce in  $\text{IL-1}\beta$  levels (% of inhibition: AE:  $33 \pm 0$  and BuOH:  $35 \pm 0$ ) ( $P < 0.05$ ) (Fig. 5B).

The indomethacin treatment showed a significant enhancement in  $\text{TNF}\alpha$  levels by  $131 \pm 4$  % ( $P < 0.01$ ) (Fig. 5A) and a significant inhibition in  $\text{IL-1}\beta$  levels by  $41 \pm 0$  % ( $P < 0.01$ ) (Fig. 5B).

### *3.2. Pleurisy induced by bradykinin, histamine or substance P*

#### *3.2.1. Effects of rhizomes extracts of Solidago chilensis and indomethacin on cellular migration and exudation*

The rhizomes aqueous extract and their fractions analyzed significantly reduced leukocyte and mononuclear influxes in the pleurisy induced by BK, HIS or SP ( $P < 0.05$ ) (Table 1) and neutrophils in the pleurisy induced by HIS or SP ( $P < 0.05$ )

(Table 1). However only aqueous residue (AR: 50 mg/kg) inhibited neutrophils induced by BK ( $P < 0.05$ ) (Table 1). In this protocol no extracts inhibited the exudation ( $P > 0.05$ ) (results not shown).

In relation to indomethacin as expected, this drug significantly inhibited leukocytes and neutrophils stimulated by all studied phogogens ( $P < 0.05$ ) (Table 1). Indomethacin was also able to inhibit mononuclears induced by either, BK and HIS ( $P < 0.05$ ) (Table 1) and exudation induced by HIS ( $P < 0.05$ ) (results not shown).

#### 4. Discussion

Our results demonstrated that ethanolic and aqueous extracts from rhizomes, leaves, and inflorescences of *Solidago chilensis* have important anti-inflammatory properties which inhibit the inflammation caused by different phlogistic agents in an acute model of inflammation, in mice. Furthermore, in this particular model, the rhizomes aqueous extract displayed an anti-inflammatory effect at lower doses than did the other extracts analyzed by inhibiting the same inflammatory parameters. The observed anti-inflammatory effects of the rhizomes aqueous extract and its two derived fractions were similar to those obtained with animals pre-treated with indomethacin, an inhibitor of cyclooxygenase.

The antiinflammatory actions of *Solidago chilensis* were demonstrated by inhibition of leukocytes in the pleurisy induced by different phogogens: carrageenan, bradykinin, histamine and substance P. The antiinflammatory effect was more evident in animals pretreated with aqueous extract and butanolic fraction, once lower doses of these (25 mg/kg) inhibited the same inflammatory parameters than aqueous residue (50 mg/kg).

Leukocytes migration in response to inflammatory stimulus involves interaction of leukocytes with chemotactic/chemoattractant and expression of adhesion molecules (Schmid-Schonbein, 2006).

Carrageenan, bradykinin, histamine and substance P are substances involved in the inflammatory responses promoting the recruitment of leukocytes and/or exudation by different mechanisms (Saleh et al., 1997; Fröde-Saleh et al., 1999; Endo, 2001; Santos et al., 2003; O'Connor et al., 2004).

In our work *Solidago chilensis* inhibited the leukocytes induced by all the studied phagogens. This inhibitory effect was associated with a marked reduction of myeloperoxidase and adenosine-deaminase activities, as well as the inhibition of  $\text{TNF}\alpha$  and  $\text{IL-1}\beta$  levels.

Many studies have been demonstrated that the release of myeloperoxidase (MPO) or adenosine deaminase (ADA) from leukocytes at the site of injury reflect the activation of both neutrophils and lymphocytes (Fröde and Medeiros, 2001). The decrease of these enzymes can corroborate to the inhibitory effect on both neutrophils and mononuclears.

$\text{TNF}\alpha$  and  $\text{IL-1}\beta$  are recognize to stimulate cellular chemotaxis and adhesion molecules expression (Borish and Steinke, 2003).

Nitric oxide is another important mediator that is recognized to be involved in exudation and leukocyte migration in the inflammatory process (Cuzzocrea et al., 2000).

We can hypothesized that the anti-inflammatory actions of *Solidago Chilensis* in the mouse pleurisy model may be direct to the inhibition of  $\text{TNF}\alpha$  and  $\text{IL-1}\beta$  levels, as well as inhibition of pro-inflammatory mediators (substance P, bradykinin, histamine and nitric oxide levels) at local of inflammation. This hypothesis is based

on the fact that  $\text{TNF}\alpha$  and  $\text{IL-1}\beta$  can release many proinflammatory mediators such as SP, BK and histamine to the local inflammatory process. Furthermore these phlogistic agents can release  $\text{TNF}\alpha$  and  $\text{IL-1}\beta$  from activated cells promoting the amplification of inflammatory cascade. Example can be cited which  $\text{TNF}\alpha$  and  $\text{IL-1}\beta$  can release nitric oxide in experimental model of arthritis (O'Shaughnessy et al., 2006).  $\text{IL-1}\beta$  can also release substance P and nitric oxide via cyclooxygenase-2 pathway in rat dorsal root ganglion cells in *in vitro* experiments (Morioka et al., 2002). Bradykinin promotes the neutrophils influx and release of  $\text{TNF}\alpha$  and  $\text{IL-1}\beta$  in different inflammation models (Santos et al., 2003).  $\text{TNF}\alpha$  and  $\text{IL-1}\beta$  can induce histamine-forming enzyme histidine decarboxylase to release histamine from mast cells and basophils promoting immune responses and variety of inflammatory diseases (Endo, 2001).

It is important to comment that the constituents of *Solidago Chilensis* alone or together can be involved in these anti-inflammatory effects demonstrated here.

Many studies *in vivo* or *in vitro* have addressed the antiinflammatory effects of flavonoids such as the inhibition of cytokines including tumour necrosis factor- $\alpha$  in different inflammatory and allergy models [Nair et al., 2006]; adhesion molecules such as E-selectin [Takano-Ishikawa et al., 2003]; inducible isoforms of cyclooxygenase, nitric oxide, protein exudation and leukocyte influx [Pelzer et al., 1998; Sakata et al., 2003].

Antiinflammatory properties of sesquiterpenes compounds have also been demonstrated by Feltenstein et al. (2004) and Jimenez-Estrada et al. (2006) by inhibiting paw oedema induced by carrageenan in rats, or by preventing NF-kappa B and NF-AT activating (Siedle et al., 2004).

Kim et al (2006) have also been related that saponins inhibited VCAM-1 and ICAM-1 expression on human endothelial cells stimulated by  $\text{TNF}\alpha$ .

## **Conclusion**

Based on the results described here we can conclude that *Solidago chilensis* rhizomes, leaves, and inflorescences ethanolic and aqueous extracts have an important anti-inflammatory effect, inhibiting cells in the inflammation caused by carrageenan. In addition, the rhizomes aqueous extract and its derived fractions decreased the pro-inflammatory mediators release into the site of the inflammatory process. The rhizomes aqueous extract and the butanolic fraction showed more evident anti-inflammatory actions.

## **Acknowledgements**

The authors would like to thank student Karen Luise Lang for providing excellent technical support during the study. This study was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil).



## References

- Apáti, P., Szentmihályi, K., Kristó, Sz.T., Papp, I., Vinkler, P., Szoke, É., Kéry, Á., 2003. Herbal remedies of *Solidago* – correlation of phytochemical characteristics and antioxidative properties. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 32, 1045-1053.
- Batyuk, V.S., Kovaleva, S.N., 1985. Flavonoids of *Solidago Canadensis* and *Solidago virgaurea*. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii* 21, 566-567.
- Bohlmann, F., Fritz, U., King, R.M., Robinson, H., 1980. Sesquiterpene and diterpene derivatives from *Solidago* species. *Phytochemistry* 19, 2655-2661.
- Borish, L.C., Steinke, J.W., 2003. Cytokines and chemokines. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 111, S460-475.
- Brazilian Pharmacopoeia, 1929. Companhia Editora Nacional, São Paulo, pp. 99-100.
- Campos, M.M., Calixto, J.B., 1995. Involvement of B<sub>1</sub> or B<sub>2</sub> receptors in bradykinin-induced rat paw oedema. *British Journal of Pharmacology* 114, 1005-1013.
- Cuzzocrea, S., Mazzon, E., Calabro, G., Dugo, L., De Sarro, A., Van de Loo, F.A., Caputi, A.P., 2000. Inducible nitric oxide synthase-knockout mice exhibit resistance to pleurisy and lung injury caused by carrageenan. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 162, 1859-1866.
- Da Cunha, F.M., Fröde, T.S., Mendes, G.I., Malheiros, A., Cechinel, V., Yunes, R., Calixto, J.B., 2001. Additional evidence of the antiinflammatory and anti-allergic properties of the sesquiterpene polygodial. *Life Sciences* 70, 159-169.

- Di Rosa, M., Lalenti, A., Ianaro, A., Sautenbin, I., 1996. Interaction between nitric oxide and cyclooxygenase pathway. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 54, 229-238.
- Duarte, M.C.T., Figueira, G.M., Sartoratto, A., Rehder, V.L.G., Delarmelina, C., 2005. *Anti-Candida* activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 97, 305-311.
- Endo, Y., 2001. Induction of histidine decarboxylase in inflammation and immune responses. *Nippon Yakurigaku Zasshi Folia Pharmacologica Japonica* 118, 5-14.
- Feltenstein, M.W., Schqhly, W., Warnick, J.E., Fischer, N.H., Sufka, K.J., 2004. Anti-inflammatory and anti-hyperalgesic effects of sesquiterpene lactones from *Magnolia* and Bear's foot. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 79, 299-302.
- Fröde, T.S., Medeiros, Y.S., 2001. Myeloperoxidase and adenosine-deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Mediators of Inflammation* 10, 223-227.
- Fröde-Saleh, T.S., Calixto, J.B., Medeiros, Y.S., 1999. Analysis of the inflammatory response induced by substance P in the mouse pleural cavity. *Peptides* 20, 259-265.
- Giusti, G., Galanti, B., 1984. Adenosine deaminase: colorimetric method. In: Bergmeyer, H.U. *Methods of enzymatic analysis*. Verlac Chemie, New York, p. 315-323.
- Güntner, C., Barra, C., Cesio, M.V., Dellacassa, E., Fernando, L., Ferreira, F., García, G., González, G., Heinzen, H., Lloret, A., Lorenzo, D., Menéndez, P., Paz, D., Soule, S., Vázquez, A., Moyna, P., 1999. Antioxidant properties of *Solidago chilensis* L. flavonoids. *Acta Horticulturae* 501, 159-162.

- Jimenez-Estrada, M., Chilpa, R.R., Apan, T.R., Lledias, F., Hansberg, W., Arrieta, D., Aguilar, F.J.A., 2006. Anti-inflammatory activity of cacalol and cacalone sesquiterpenes isolated from *Psacalium decompositum*. *Journal of Ethnopharmacology* 105, 34-38.
- Kim, J.Y., Kim, D.H., Kim, H.G., Song, G., Chung, Y.C., Roh, S.H., Jeong, H.G., 2006. Inhibition of tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced expression of adhesion molecules in human endothelial cells by the saponins derived from roots of *Platycodon grandiflorum*. *Toxicology and Applied Pharmacology* 210, 150-156.
- Lu, T., Menelaou, M.A., Vargas, D., Fronczek, F.R., Fischer, N.K., 1993. Polyacetylenes and diterpenes from *Solidago canadensis*. *Phytochemistry* 32, 1483-1488.
- Morel, A.F., Dias, G.O., Porto, C., Simionatto, E., Stuker, C.Z., Dalcol, I.I., 2006. Antimicrobial activity of extractives of *Solidago microglossa*. *Fitoterapia* 77, 453-455.
- Morioka, N., Inoue, A., Hanada, T., Kumagai, K., Takeda, K., Ikoma, K., Hide, I., Tamura, Y., Shiomi, H., Dohi, T., Nakata, Y., 2002. Nitric oxide synergistically potentiates interleukin-1  $\beta$ -induced increase of cyclooxygenase-2 mRNA levels, resulting in the facilitation of substance P release from primary afferent neurons: involvement of cGMP-independent mechanisms. *Neuropharmacology* 43, 868-876.
- Nair, M.P., Mahajan, S., Reynolds, J.L., Aalinkeel, R., Nair, H., Schwartz, S.A., Kandaswami, C., 2006. The flavonoid quercetin inhibits proinflammatory cytokine (tumor necrosis factor  $\alpha$ ) gene expression in normal peripheral blood

mononuclear cells via modulation of the NF- $\kappa$ B system. *Clinical and Vaccine Immunology* 13, 319-328.

O'Connor, T.M., O'Connell, J., O'Brien, D.I., Goode, T., Bredin, C.P., Shanahan, F., 2004. The role of substance P in inflammatory disease. *Journal of Cellular Physiology* 201, 167-180.

O'shaughnessy, M.C., Vetsika, E.K., Inglis, J.J., Carleson, J., Haigh, R., Kidd, B.L., Winyard, P.G., 2006. The effect of substance P on nitric oxide release in a rheumatoid arthritis model. *Inflammation Research* 55, 236-240.

Pelzer, L.E., Guardia, T., Osvaldo Juarez, A., Guerreiro, E., 1998. Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. *IL Farmaco* 53, 421-424.

Rao, T.S., Curie, J.L., Shaffer, A.F., Isakson, P.C., 1993. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)-and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. *Inflammation* 17, 723-741.

Reznicek, G., Jurenitsch, J., Plasun, M., Korhammer, S., Haslinger, E., Hiller, K., Kubelka, W., 1991. Four major saponins from *Solidago canadensis*. *Phytochemistry* 30, 1629-1633.

Sakata, K., Hirose, Y., Qiao, Z., Tanaka, T., Mori, H., 2003. Inhibition of inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase by flavonoid hesperidin in mouse macrophage cell line. *Cancer Letters* 199, 139-145.

Saleh, T.S.F., Calixto, J.B., Medeiros, Y.S., 1996. Antiinflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. *British Journal of Pharmacology* 118, 811-819.

- Saleh, T.S.F., Calixto, J.B., Medeiros, Y.S., 1997. Pro-inflammatory effects induced by bradykinin in a murine model of pleurisy. *European Journal of Pharmacology* 331, 43-52.
- Saleh, T.S.F., Calixto, J.B., Medeiros, Y.S., 1999. Effects of antiinflammatory drugs upon nitrate and myeloperoxidase levels in the mouse pleurisy induced by carrageenan. *Peptides* 20, 949-956.
- Santos, D.R., Calixto, J.B., Souza, G.E., 2003. Effect of a kinin B2 receptor antagonist on LPS- and cytokine-induced neutrophil migration in rats. *British Journal of Pharmacology* 139, 271-278.
- Schmeda-Hirschmann, G., 1987. A labdan diterpene from *Solidago chilensis* Roots. *Planta Medica* 2, 179-180.
- Schmeda-Hirschmann, G., Rodriguez, J., Astudillo, L., 2002. Gastroprotective activity of the diterpene solidagenone and its derivatives on experimentally induced gastric lesions in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 81, 111-115.
- Schmid-Schonbein, G.W., 2006. Analysis of inflammation. *Annual Review of Biomedical Engineering* 8, 93-151.
- Siedle, B., Garcia-Pineros, A.J., Murillo, R., Schulte-Monting, J., Castro, V., Rungeler, P., Klaas, C.A., Da Costa, F.B., Kisiel, W., Merfort, I., 2004. Quantitative structure-activity relationship of sesquiterpene lactones as inhibitors of the transcription factor NF-kappaB. *Journal of Medicinal Chemistry* 47, 6042-6054.
- Takano-Ishikawa, Y., Goto, M., Yamaki, K., 2003. Inhibitory effects of several flavonoids on E-selectin expression on human umbilical vein endothelial cells stimulated by tumor necrosis factor-alpha. *Phytotherapy Research* 17, 1224-1227.

Weyerstahl, P., Marschall, H., Christiansen, C., Kalembe, D., Góra, J., 1993.

Constituents of the essential oil of *Solidago canadensis* ("Goldenrod") from Poland- A correction. *Planta Medica Letters* 59, 281-282.

## Legends

Figure 1- Effect of *Solidago chilensis* rhizomes aqueous extract (AE: 10-200 mg/kg, i.p.) on leukocytes (A), neutrophils (B), mononuclears (C) and exudation (D) on carrageenan-induced pleurisy in mice.  $*P < 0.05$  and  $**P < 0.01$ . C = Control = Saline, Cg = Carrageenan (1%), Indo = Indomethacin (5 mg/kg, i.p.). N = 5-8.

Figure 2- Effect of butanolic fraction of *Solidago chilensis* rhizomes (BuOH: 10-200 mg/kg, i.p.) on leukocytes (A), neutrophils (B), mononuclears (C) and exudation (D) on carrageenan-induced pleurisy in mice.  $*P < 0.05$  and  $**P < 0.01$ . C = Control = Saline, Cg = Carrageenan (1%), Indo = Indomethacin (5 mg/kg, i.p.). N = 5-8.

Figure 3- Effect of aqueous residue of *Solidago chilensis* rhizomes (AR: 10-200 mg/kg, i.p.) on leukocytes (A), neutrophils (B), mononuclears (C) and exudation (D) on carrageenan-induced pleurisy in mice.  $*P < 0.05$  and  $**P < 0.01$ . C = Control = Saline, Cg = Carrageenan (1%), Indo = Indomethacin (5 mg/kg, i.p.). N = 5-8.

Figure 4- Effect of aqueous extract (AE: 25 mg/kg, i.p.), butanolic fraction (BuOH: 25 mg/kg, i.p.) or aqueous residue (AR: 50 mg/kg, i.p.) of *Solidago chilensis* rhizomes on myeloperoxidase (A) and adenosine-deaminase (B) activities and nitrite/nitrate levels (C) on carrageenan-induced pleurisy in mice.  $*P < 0.05$  and  $**P < 0.01$ . C = Control = Saline, Cg = Carrageenan (1%), Indo = Indomethacin (5 mg/kg, i.p.). N = 5-8.

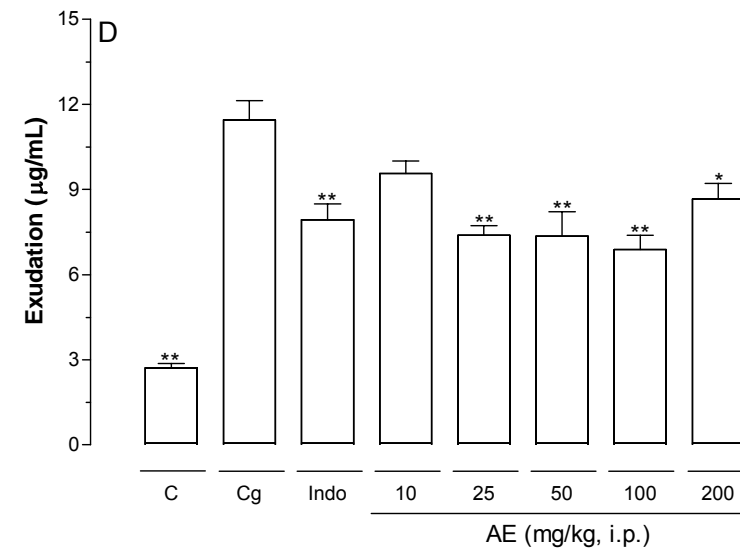
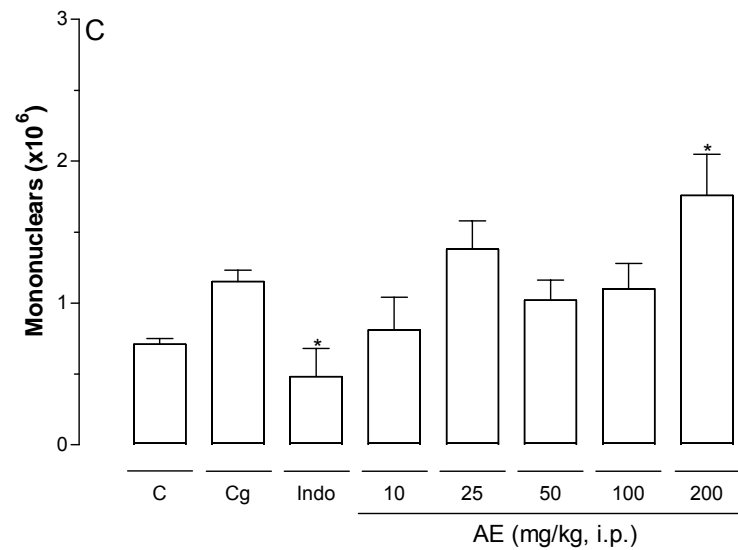
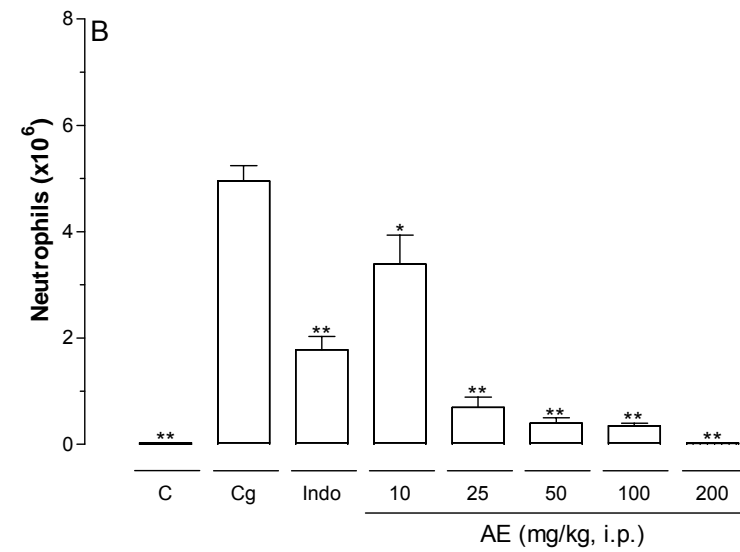
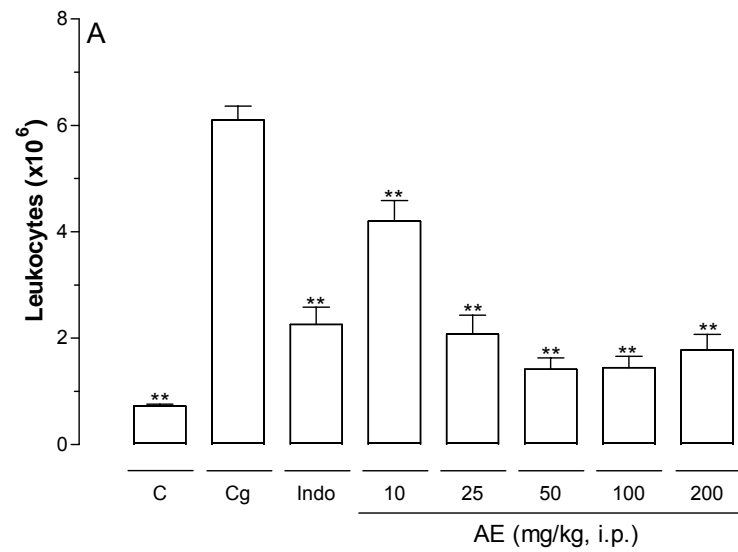
Figure 5- Effect of aqueous extract (AE: 25 mg/kg, i.p.), butanolic fraction (BuOH: 25 mg/kg, i.p.) or aqueous residue (AR: 50 mg/kg, i.p.) of *Solidago chilensis* rhizomes on  $\text{TNF}\alpha$  (A) and  $\text{IL-1}\beta$  (B) levels on carrageenan-induced pleurisy in mice.  $*P < 0.05$  and  $**P < 0.01$ . C = Control = Saline, Cg = Carrageenan (1%), Indo = Indomethacin (5 mg/kg, i.p.). N = 5-8.

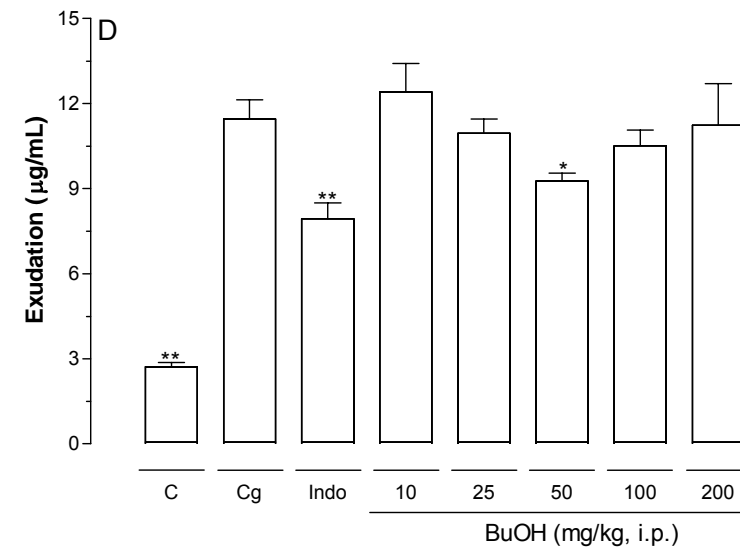
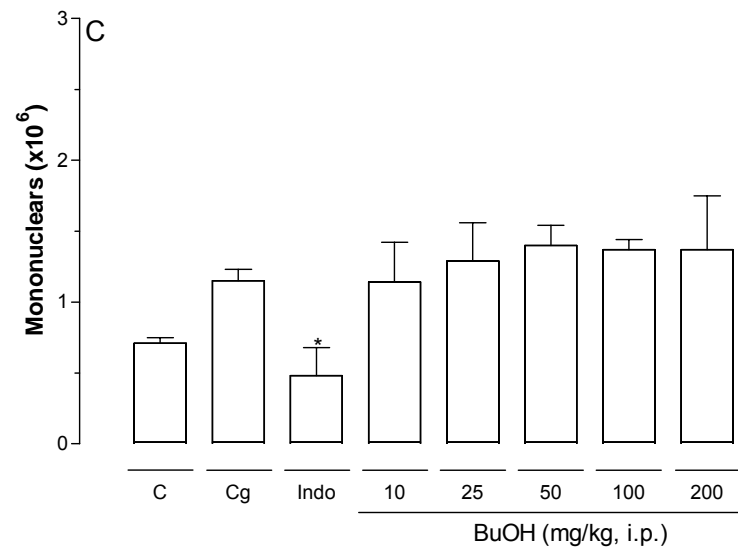
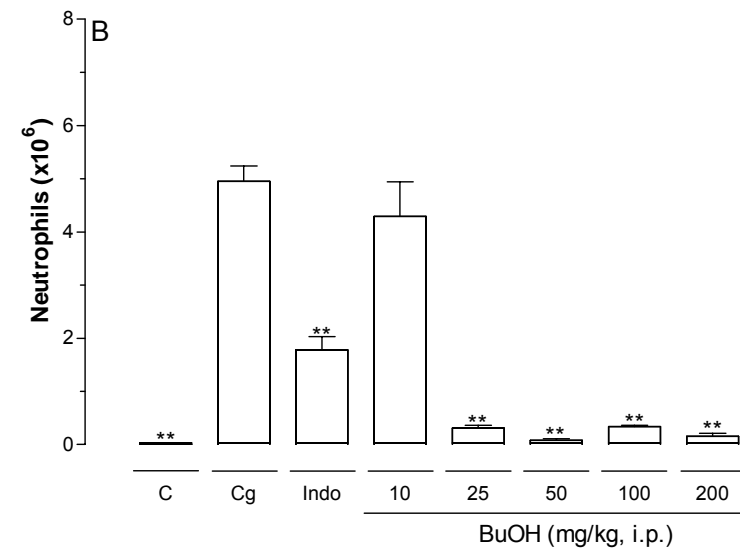
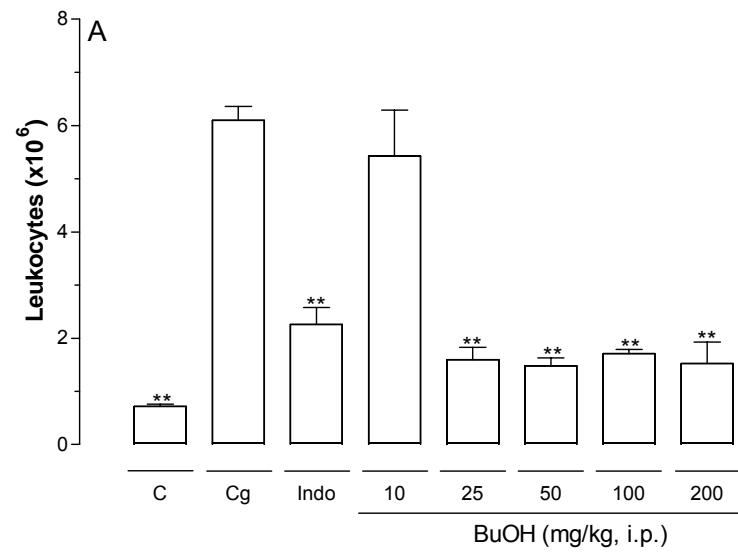
Table 1- Effects of *Solidago chilensis* rhizomes extracts upon cell migration in the pleurisy induced by bradykinin, histamine or substance P.

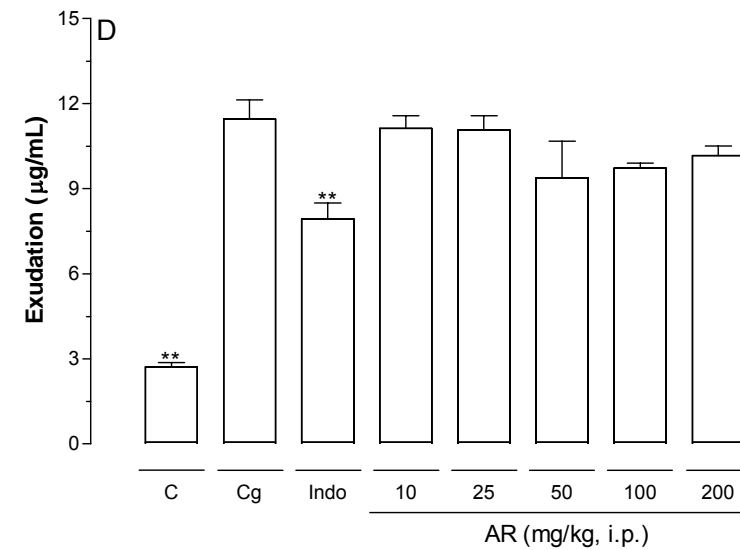
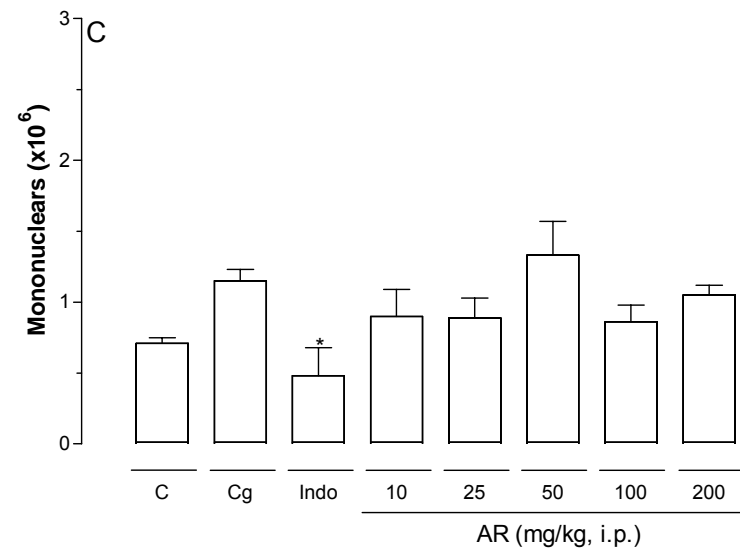
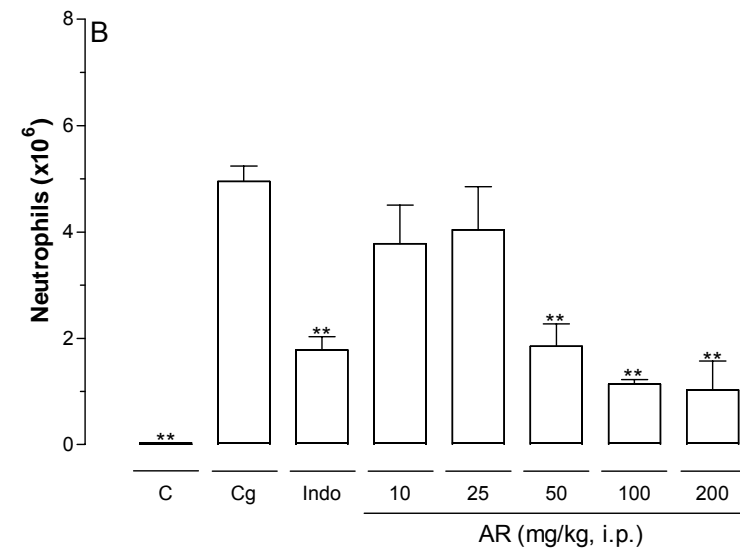
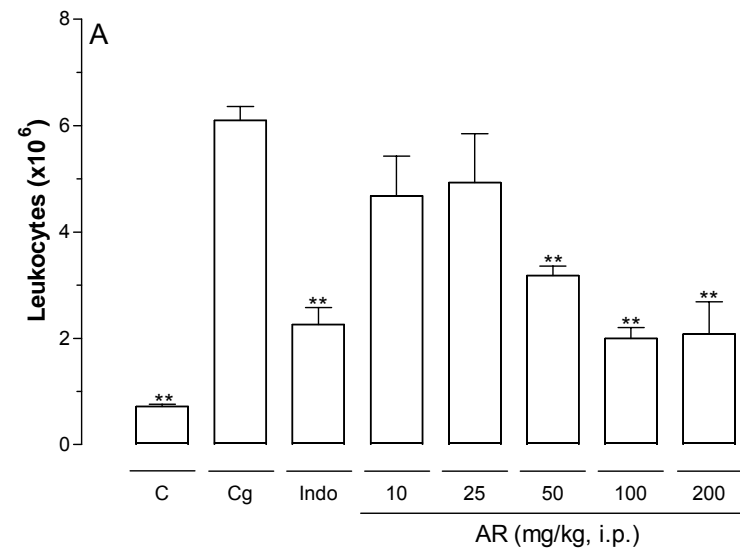
Groups/Doses	Bradykinin	Histamine	Substance P
<b>Leukocytes (x10<sup>6</sup>)</b>			
C <sup>a</sup>	2.40 ± 0.21	2.29 ± 0.36	2.72 ± 0.15
AE 25 mg/kg <sup>b</sup>	1.08 ± 0.17**	0.95 ± 0.11**	1.17 ± 0.15**
BuOH 25 mg/kg <sup>b</sup>	1.40 ± 0.10**	1.23 ± 0.20*	1.12 ± 0.34**
AR 50 mg/kg <sup>b</sup>	1.22 ± 0.12**	1.01 ± 0.09**	1.56 ± 0.20**
Indo 5 mg/kg <sup>b</sup>	0.97 ± 0.19**	1.01 ± 0.15**	2.10 ± 0.29*
<b>Neutrophils (x10<sup>6</sup>)</b>			
C <sup>a</sup>	0.21 ± 0.07	0.41 ± 0.09	0.91 ± 0.13
AE 25 mg/kg <sup>b</sup>	0.12 ± 0.05	0.04 ± 0.01**	0.10 ± 0.02**
BuOH 25 mg/kg <sup>b</sup>	0.11 ± 0.04	0.21 ± 0.02*	0.14 ± 0.03**
AR 50 mg/kg <sup>b</sup>	0.06 ± 0.02*	0.09 ± 0.01*	0.14 ± 0.01**
Indo 5 mg/kg <sup>b</sup>	0.04 ± 0.01*	0.08 ± 0.02**	0.60 ± 0.08**
<b>Mononuclears (x10<sup>6</sup>)</b>			
C <sup>a</sup>	2.19 ± 0.22	1.88 ± 0.27	1.81 ± 0.09
AE 25 mg/kg <sup>b</sup>	0.96 ± 0.13**	0.91 ± 0.11*	1.07 ± 0.14**
BuOH 25 mg/kg <sup>b</sup>	1.29 ± 0.10**	1.02 ± 0.19*	0.98 ± 0.31*
AR 50 mg/kg <sup>b</sup>	1.16 ± 0.12**	0.92 ± 0.09*	1.42 ± 0.19*
Indo 5 mg/kg <sup>b</sup>	0.93 ± 0.19**	0.93 ± 0.15*	1.50 ± 0.23

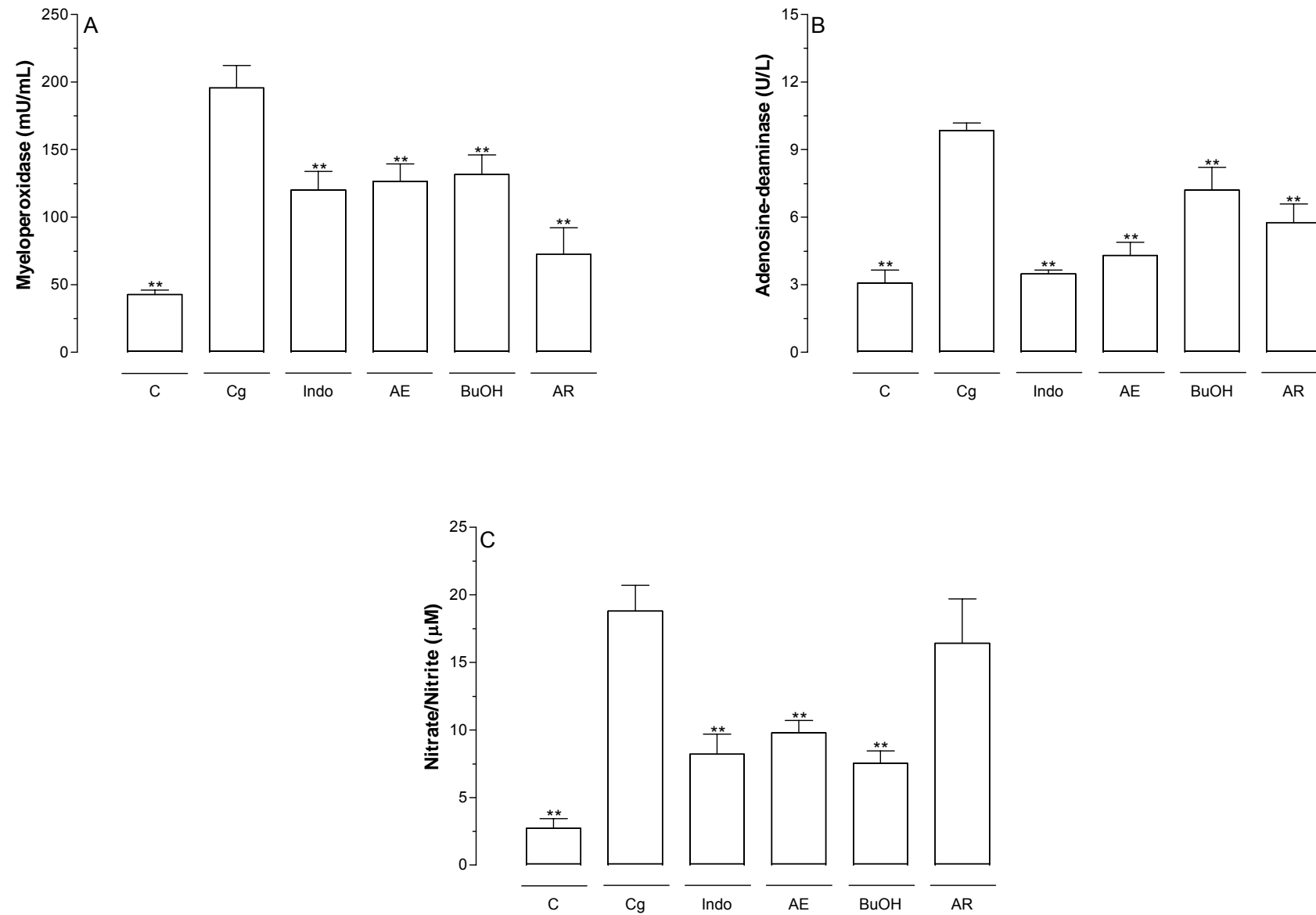
Aqueous extract (AE: 25 mg/kg), butanolic fraction (BuOH: 25 mg/kg) or aqueous residue (AR: 50 mg/kg) of *Solidago chilensis* rhizomes administered in different groups of animals 0.5 h before pleurisy induction by bradykinin, histamine or substance P. C = Bradykinin (10 nmol/cav.), histamine (100 µg/cav.) or substance P (20 nmol/cav.). Indo = Indomethacin (5 mg/kg). \**P* < 0.05 and \*\**P* < 0.01. a = administered by intrapleural route; b = administered by intraperitoneal route. N = 5 to 8.

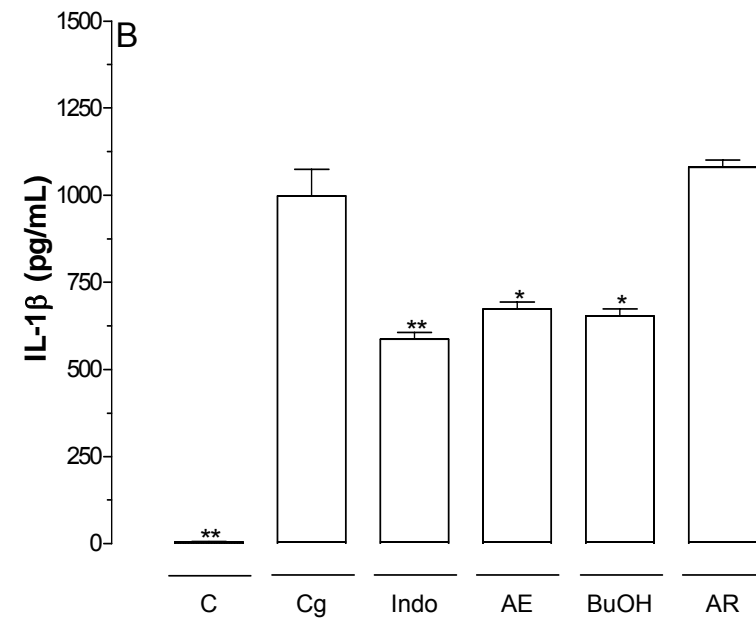
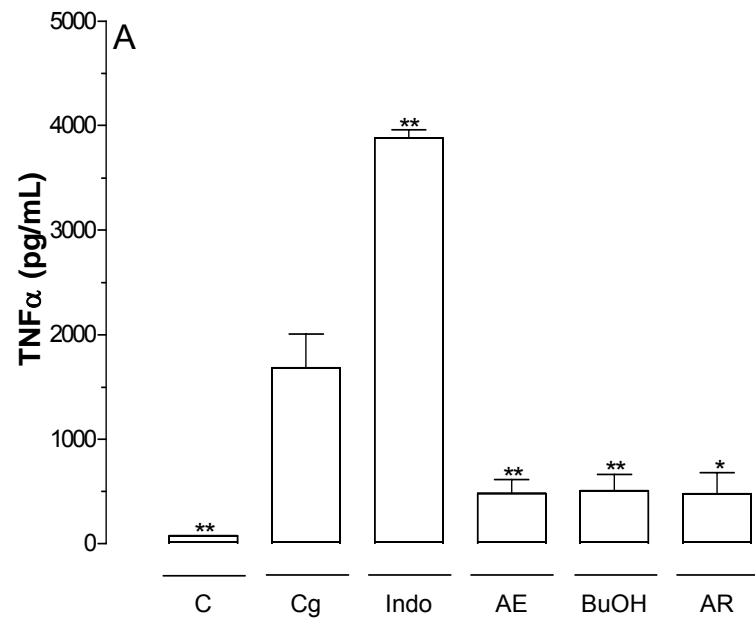












#### 4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que entre os diferentes extratos estudados: etanólicos e aquosos das raízes, folhas e inflorescências de *Solidago chilensis*, os aquosos apresentaram melhores efeitos antiinflamatórios, inibindo os leucócitos e a exsudação na pleurisia induzida pela carragenina. Esta afirmação está baseada no uso de doses menores dos extratos aquosos (10-200 mg/kg), que inibiram a migração de leucócitos quando comparados as doses dos extratos etanólicos (100-200 mg/kg), e no fato de que apenas os extratos aquosos inibiram a exsudação neste processo inflamatório. Outro fator importante é que o extrato aquoso das raízes demonstrou melhor efeito antiinflamatório, quando comparado aos das folhas e das inflorescências, inibindo a exsudação em doses menores (25 mg/kg) do que as das folhas e das inflorescências (50 mg/kg).

Uma vez que o extrato aquoso das raízes foi o mais eficaz em inibir a migração leucocitária e a exsudação no modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos, todos os demais experimentos para avaliação do mecanismo da ação antiinflamatória de *Solidago chilensis* foram realizados utilizando-se o mesmo e mais duas frações obtidas a partir dele: a fração butanólica e o resíduo aquoso.

A ação antiinflamatória deste extrato e suas frações foi demonstrada pela inibição da migração de leucócitos na pleurisia induzida por diferentes agentes flogísticos: carragenina, bradicinina, histamina e substância P. O efeito mais evidente foi aquele observado nos animais tratados com o extrato aquoso e a fração butanólica, uma vez que estes em doses menores (25 mg/kg), inibiram o influxo de leucócitos quando comparado com aqueles animais tratados com o resíduo aquoso (50 mg/kg).

A migração de leucócitos em resposta a um estímulo inflamatório envolve a interação de leucócitos com as moléculas de adesão (MULLER-LADNER et al., 2005; SCHMID-SCHONBEIN, 2006). Neste contexto, o estudo realizado por Yun, DeCarlo e Hunter (2006) demonstrou uma correlação positiva entre o aumento da expressão das moléculas de adesão endotelial tipo 1 (ELAM-1), intracelular tipo 1 (ICAM-1), vascular tipo 1 (VCAM-1) e aquelas expressas em células T (CD99) com o aumento da aderência de leucócitos humanos à células endoteliais de veias umbilicais, concluindo-se que o recrutamento dos leucócitos é dependente da expressão de moléculas de adesão.

Os agentes flogísticos estudados: carragenina, bradicinina, histamina e substância P estão envolvidos na resposta inflamatória promovendo o recrutamento de leucócitos e/ou exsudação por diferentes mecanismos.

No modelo da pleurisia induzida pela carragenina foi observado aumento significativo da migração de leucócitos às custas de neutrófilos após a administração da carragenina dentro da cavidade pleural de camundongos (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996). Nesta fase ocorre um aumento da exsudação em nível local e a participação de diversos mediadores da inflamação como enzimas do tipo mieloperoxidase e adenosina-deaminase, metabólitos do óxido nítrico (nitrito e nitrito) e citocinas do tipo pró-inflamatórias (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996; 1999; FRÖDE; MEDEIROS, 2001; FRÖDE; SOUZA; CALIXTO, 2001, 2002; DALMARCO; FRÖDE; MEDEIROS, 2002, 2004). Corroborando com o descrito acima, o estudo realizado por Menegazzi e colaboradores (2006) demonstrou que a carragenina induziu o aumento da expressão de moléculas de adesão do tipo ICAM-1 no modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos.

O extrato aquoso das raízes de *Solidago chilensis* e suas frações: butanólica e resíduo aquoso também foram efetivos em inibir a migração de leucócitos às custas de mononucleares induzidos pela bradicinina, no modelo experimental estudado.

A bradicinina é um importante vasodilatador e modulador da reação inflamatória. Este mediador é rapidamente degradado pela enzima conversora de angiotensina (ECA) e outras proteinases. A inibição desta degradação aumenta a concentração e os efeitos da bradicinina. Devido ao aumento nos níveis de cálcio e à liberação de óxido nítrico derivado da ativação da NOSe, a bradicinina é estimulada e contribui para a vasodilatação. Esta substância promove também a contração de células endoteliais e a formação de edema intersticial, via ativação dos fatores de transcrição, tal como o fator de transcrição nuclear NF-kappa B (NF-κB) (FREISE; PALMES; SPIEGEL, 2006).

Estudos também têm demonstrado o efeito da bradicinina no influxo leucocitário, como por exemplo, Saleh, Calixto e Medeiros (1997) demonstraram que a bradicinina promoveu aumento do influxo de leucócitos às custas de mononucleares no modelo da pleurisia, em camundongos. Outros estudos demonstraram que no modelo de inflamação pulmonar alérgica em camundongos sensibilizados com ovoalbumina, a administração do antagonista seletivo do receptor

B<sub>1</sub> da bradicinina (R-954) reduziu o influxo de polimorfonucleares e a secreção de muco no lavado broncoalveolar destes animais (GAMA LANDGRAF et al., 2004).

Outros resultados obtidos neste estudo demonstraram, ainda, que o extrato aquoso, a fração butanólica e o resíduo aquoso das raízes de *Solidago chilensis* foram efetivos em inibir a migração leucocitária às custas da migração de neutrófilos e de mononucleares para a cavidade pleural, na inflamação mediada por histamina.

A histamina é um mediador pró-inflamatório envolvido na quimiotaxia celular e na exsudação, além da ativação de citocinas pró-inflamatórias (interleucina-1 alfa: IL-1 $\alpha$ , interleucina-6: IL-6 e interleucina-1 beta: IL-1 $\beta$ ) e na contração da musculatura lisa (JUTEL; BLASER; AKDIS, 2005; AKDIS; SIMONS, 2006; HASHIMOTO; OHATA; HONDA, 2006). Outros exemplos são os estudos *in vitro* que demonstraram que a liberação de histamina em cultura de mastócitos induzida pelo ácido lisofosfatídico (LFA) promoveu o aumento da exsudação (HASHIMOTO; OHATA; HONDA, 2006).

O estudo realizado por Da Cunha e colaboradores (2001) demonstrou aumento significativo na exsudação e na migração de leucócitos às custas de mononucleares no modelo da pleurisia induzida pela histamina, em camundongos. Saleh, Calixto e Medeiros (1999) demonstraram, também, a participação da histamina via a ativação de seu receptor H<sub>1</sub>, no modelo da pleurisia induzida por carragenina, em camundongos. Este efeito foi observado quando os animais inflamados foram tratados com terfenandina, antagonista seletivo de receptores H<sub>1</sub>, causando inibição da migração de leucócitos e de polimorfonucleares na cavidade pleural de animais com pleurisia.

Nos experimentos observou-se também que o extrato aquoso das raízes de *Solidago chilensis* e as frações butanólica e resíduo aquoso mais uma vez inibiram de forma significativa a migração de leucócitos às custas de neutrófilos e de mononucleares para a cavidade pleural na inflamação induzida pela substância P.

A substância P é um potente mediador envolvido em diversas reações inflamatórias por promover o aumento da permeabilidade vascular, a formação de edema, o aumento da expressão de moléculas de adesão em células endoteliais, a ativação de neutrófilos, além da contração da musculatura lisa (CHEN et al., 2006).

Um estudo recente relatou que em animais previamente tratados com antagonistas específicos para os receptores NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> e NK<sub>3</sub> (SR140333, SR48968 e SR142801, respectivamente), observou-se diminuição do influxo de leucócitos para a cavidade peritoneal no modelo de hiperalgesia induzida pela formalina, em ratos



(SANTOS et al., 2004). Outro estudo revelou que a substância P age via receptor de taquicicina NK<sub>1</sub> promovendo o influxo de leucócitos induzidos por TNF $\alpha$ , no modelo de inflamação cutânea, em camundongos (COSTA et al., 2006).

Nestes experimentos o extrato estudado de *Solidago chilensis* e suas frações inibiram a migração de leucócitos induzida por todos estes agentes flogísticos citados anteriormente. Este efeito foi associado à redução das atividades das enzimas mieloperoxidase e adenosina-deaminase, bem como dos níveis de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Observou-se, também, que o extrato aquoso das raízes e a fração butanólica inibiram a maioria dos parâmetros inflamatórios quando comparados ao do resíduo aquoso. Além disso, o extrato aquoso e a fração butanólica, mas não o resíduo aquoso, inibiram os níveis de IL-1 $\beta$ .

Muitos estudos têm demonstrado que a liberação da mieloperoxidase (MPO) ou adenosina-deaminase (ADA) pelos leucócitos no sítio de inflamação reflete a ativação de neutrófilos e linfócitos, respectivamente (FRÖDE; MEDEIROS, 2001; GINES et al., 2002; KINHULT et al., 2003; LAU et al., 2005). A inibição destas enzimas pode colaborar para o efeito de inibição dos leucócitos observados neste estudo.

É reconhecido que a enzima mieloperoxidase participa da defesa do hospedeiro auxiliando na destruição do agente estranho por meio da liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e também, pode estar envolvida na progressão de lesões teciduais em processos inflamatórios crônicos (HANSSON; OLSSON; NAUSEEF, 2006).

A importância desta enzima foi observada em estudos utilizando-se camundongos *knockout* para a molécula de adesão P-selectina, tendo sido constatado que esses animais apresentaram diminuição significativa da atividade da mieloperoxidase, indicando a inibição do influxo de neutrófilos ativados, no modelo de falência renal induzida por isquemia/reperfusão, em camundongos (SINGBARTL; GREEN; LEY, 2000).

Já a atividade da enzima adenosina-deaminase é proporcional à concentração do autacóide adenosina, que se encontra aumentado na inflamação, onde as células ativadas liberam grandes quantidades deste autacóide (BLACKBURN, 2003). Um estudo recente demonstrou que em camundongos deficientes de adenosina-deaminase, a aplicação desta enzima contribuiu para o aumento nos níveis de adenosina, fato este associado com a inflamação pulmonar,

a deposição de colágeno e a alteração da estrutura de vias aéreas de camundongos (CHUNN et al., 2005). Kuno e colaboradores (2006) demonstraram que a administração de um inibidor da enzima adenosina-deaminase humana (FR234938) diminuiu a produção da citocina pró-inflamatória  $\text{TNF}\alpha$  e aumentou a produção da citocina antiinflamatória interleucina-10 (IL-10) no modelo de inflamação induzido por lipopolissacarídeo (LPS), em camundongos.

Outros resultados também demonstraram que a inibição de leucócitos foi associada à inibição dos níveis das citocinas pró-inflamatórias  $\text{TNF}\alpha$  e  $\text{IL-1}\beta$ , que são reconhecidas por estimularem a quimiotaxia celular e a expressão de moléculas de adesão (BORISH; STEINKE, 2003; MOLLER; VILLIGER, 2006). Estudos *in vitro* realizados por Butler e colaboradores (2005) demonstraram que o  $\text{TNF}\alpha$  estimulou a quimiotaxia de neutrófilos, em cultura de células endoteliais de veias umbilicais humanas.

No modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos, já foi relatado que tanto a  $\text{IL-1}\beta$  como o  $\text{TNF}\alpha$  promoveram aumento dos leucócitos e dos neutrófilos no lavado pleural dos camundongos inflamados (FRÖDE; SOUZA; CALIXTO, 2001). Estudos *in vitro* relataram que o  $\text{TNF}\alpha$  induziu significativamente a expressão de moléculas de adesão E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1 e a ativação do NF- $\kappa$ B em culturas de células endoteliais da microvasculatura pulmonar humana (JIANG et al., 2005).

Neste contexto vale a pena comentar sobre o fator de transcrição NF- $\kappa$ B, que possui papel central na regulação da expressão de genes que codificam as citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e  $\text{TNF}\alpha$ ), quimocinas (IL-8), moléculas de adesão (ICAM-1) e enzimas pró-inflamatórias (NOSi e ciclooxigenase-2) (CHRISTMAN; SADIKOT; BLACKWELL, 2000). Desta forma, a regulação e o controle da ativação do fator NF- $\kappa$ B pode ser uma importante estratégia terapêutica na inibição da liberação de mediadores pró-inflamatórios e da expressão de moléculas de adesão (BREMER; HEINRICH, 2002; ZINGARELLI; SHEEHAN; WONG, 2003). Estudos demonstraram ainda que a atividade do NF- $\kappa$ B está significativamente aumentada 24 h e diminuída 48 h após a indução da inflamação no modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em ratos. Este aumento na atividade foi correlacionado com a formação do exsudato e a infiltração de leucócitos na cavidade pleural destes animais (D'ACQUISTO et al., 1999).

O vegetal em estudo também inibiu a exsudação e a concentração de nitrato/nitrito no modelo da pleurisia induzida pela carragenina. Observou-se, ainda, que o extrato aquoso das raízes e a fração butanólica, mas não o resíduo aquoso, inibiram a exsudação e os níveis de nitrato/nitrito. Este fato demonstra um efeito antiinflamatório mais evidente nos animais tratados com o extrato aquoso e a fração butanólica.

O óxido nítrico é um importante mediador pró-inflamatório envolvido na exsudação (CUZZOCREA et al., 2000; DAL SECCO et al., 2006; PRADO et al., 2006). No modelo do edema de pata induzido por enterotoxina B de *Staphylococcus*, observou-se aumento da exsudação e dos níveis de mieloperoxidase, em camundongos, indicando a presença de leucócitos ativados. O edema e a atividade de mieloperoxidase foram inibidos quando os animais receberam tratamento prévio com N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) ou aminoguanidina (inibidores seletivos da NOSi), por via intravenosa ou subplantar (FRANCO-PENTEADO et al., 2001). Outros estudos ainda relataram que na pleurisia induzida por carragenina ocorreu aumento da migração de leucócitos e dos níveis de metabólitos do óxido nítrico, em camundongos (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1999; DALMARCO; FRÖDE; MEDEIROS, 2002, 2004).

Além disso, a inibição da exsudação observada com o extrato aquoso das raízes e suas frações também parece estar relacionada à inibição das citocinas pró-inflamatórias TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , reconhecidas por promoverem a exsudação em diferentes modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* (FRÖDE; SOUZA; CALIXTO, 2001; CHUNG et al., 2005; CUZZOCREA et al., 2006).

Todos os efeitos antiinflamatórios de *Solidago chilensis* observados neste estudo poderiam ser atribuídos em parte aos seus constituintes flavonoídicos, para os quais já foram demonstradas propriedades antiinflamatórias.

Muitos estudos *in vitro* e *in vivo* já relataram tais efeitos antiinflamatórios dos flavonóides. Por exemplo Ueda, Yamazaki e Yamazaki (2004) demonstraram que substâncias desta classe inibiram os níveis de TNF $\alpha$  em experimentos *in vitro* estimulados por LPS, bem como em experimentos *in vivo* (modelo de edema de orelha) induzido por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA). O flavonóide quercetina também diminuiu a produção e a expressão da citocina pró-inflamatória TNF $\alpha$  em cultura de mononucleares de humanos estimulados por acetato de forbol miristato (PMA). Este efeito foi associado à inibição do NF- $\kappa$ B (NAIR et al., 2006).

Estudo relatou ainda que os flavonóides inibiram a expressão de moléculas de adesão do tipo E-selectina em células endoteliais de veias umbilicais humanas estimuladas por  $\text{TNF}\alpha$  (TAKANO-ISHIKAWA; GOTO; YAMAKI, 2003).

Outros estudos demonstraram que os flavonóides apresentaram efeitos antiinflamatórios inibindo a exsudação no modelo de edema de pata induzido pela carragenina, em camundongos (PELZER et al., 1998). Os flavonóides inibiram também a enzima ciclooxigenase tipo 2 (COX-2) em cultura de células RAW 264.7 estimuladas por LPS e também as enzimas ciclooxigenase tipo 1 (COX-1) e a lipoxigenase (LOX) em homogenatos de plaquetas obtidas de sangue bovino (CHI et al., 2001).

Estudo demonstrou ainda que a liberação de óxido nítrico induzida por LPS em células J774 foi inibida por flavonóides por diminuição da expressão da NOSi e pela inibição da atividade da NOSi no pulmão de ratos estimulados pelo LPS (PERGOLA et al., 2006).

Outras substâncias já identificadas nas espécies do gênero *Solidago* são as saponinas. Estudos realizados por Kim e colaboradores (2006a) demonstraram que as saponinas inibiram significativamente a adesão de monócitos humanos às células endoteliais induzida pelo  $\text{TNF}\alpha$ , bem como diminuíram a expressão de ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) para molécula de adesão vascular tipo 2 (VCAM-2) e molécula de adesão intraceular tipo 1 (ICAM-1) em cultura de células endoteliais estimuladas por  $\text{TNF}\alpha$ , este efeito foi devido à inibição da ativação de NF- $\kappa$ B. Huang e colaboradores (2005) demonstraram que uma saponina triterpênica inibiu também a expressão da molécula de adesão do tipo ICAM-1 na aorta de ratos e inibiu o aumento da permeabilidade capilar induzida pelo calor, em ratos.

Kang e colaboradores (2005) relataram que as saponinas inibiram a liberação de óxido nítrico e os níveis de  $\text{TNF}\alpha$  em cultura de macrófagos peritoneais estimulados por LPS.

Estudo demonstrou também que outras saponinas apresentaram efeitos antiinflamatórios inibindo os níveis de  $\text{TNF}\alpha$  e  $\text{PGE}_2$  no modelo da bolsa de ar induzido pela carragenina, em ratos (KIM et al., 2006b).

Os sesquiterpenos, também já isolados de plantas do gênero *Solidago*, são substâncias conhecidas por seus efeitos antiinflamatórios *in vitro* e *in vivo*. Como por exemplo, estudos demonstraram que os sesquiterpenos inibiram os níveis de NO em

linhagem de macrófagos de camundongos RAW 264.7 ativados por LPS e IFN- $\gamma$  (WANG; UNEHARA; KITANAKA, 2005).

Os compostos sesquiterpenos apresentaram ainda atividade antiinflamatória inibindo o exsudato no modelo de edema de pata induzida pela carragenina, em ratos (JIMENEZ-ESTRADA et al., 2006). Outros estudos demonstraram que os sesquiterpenos diminuíram o edema e a hiperalgisia, também no mesmo modelo de inflamação, via inibição da ciclooxigenase tipo 2 (COX-2) e de citocinas pró-inflamatórias (FELTENSTEIN et al., 2004) ou ainda, por inibir a ativação de NF- $\kappa$ B via aumento da proteína inibidora I- $\kappa$ B (HEHNER et al., 1999). Além disso, estudos demonstraram ainda que os sesquiterpenos do tipo lactonas isolados da Arnica também inibiram a ativação dos fatores de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) e de células T (NF-AT) em concentrações micromolares (MERFORT, 2003; SIEDLE et al., 2004).

Vale a pena comentar que neste estudo os efeitos antiinflamatórios do extrato aquoso, fração butanólica e resíduo aquoso das raízes de *Solidago chilensis* apresentaram ainda, efeitos antiinflamatórios semelhantes aos da indometacina (inibidor de ciclooxigenase). Estes resultados demonstraram que *Solidago chilensis* e a indometacina podem ter vias comuns de ação antiinflamatória.

Uma vez que a interação entre estes mediadores e células é bastante complexa foi possível propor um mecanismo para a ação antiinflamatória de *Solidago chilensis* no modelo estudado. Um dos mecanismos poderia ser atribuído à inibição dos níveis de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , bem como de mediadores pró-inflamatórios como bradicinina, histamina, substância P e óxido nítrico no local da inflamação. Estes mediadores BK, HIST, SP, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e NO são capazes de promover a liberação um do outro resultando na amplificação da resposta inflamatória (ENDO, 2001; CAMPOS et al., 2002; MORIOKA et al., 2002; SANTOS; CALIXTO; SOUZA, 2003; PASSOS et al., 2004; COSTA et al., 2006; O'SHAUGHNESSY et al., 2006) (Figura 2).

Por fim, os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que *Solidago chilensis* apresentou importante efeito antiinflamatório. O extrato aquoso e suas frações foram efetivos em inibir de forma significativa os parâmetros inflamatórios: migração de leucócitos, exsudação, enzimas mieloperoxidase e adenosina-deaminase, o óxido nítrico e citocinas TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , bem como a migração

leucocitária induzida por bradicinina, histamina e substância P, no modelo de inflamação estudado.

## 5. CONCLUSÕES

1. O efeito antiinflamatório do extrato aquoso das raízes de *Solidago chilensis* foi mais evidente que o dos extratos etanólicos e/ou aquosos das outras partes da planta.
2. O mecanismo de ação antiinflamatório parece estar relacionado à inibição de enzimas (mieloperoxidase e adenosina-deaminase), citocinas ( $\text{TNF}\alpha$  e  $\text{IL-1}\beta$ ), bem como de mediadores pró-inflamatórios (óxido nítrico, bradicinina, histamina e substância P).
3. O efeito antiinflamatório do extrato aquoso das raízes de *Solidago chilensis* parece estar relacionado às suas frações: butanólica e resíduo aquoso.

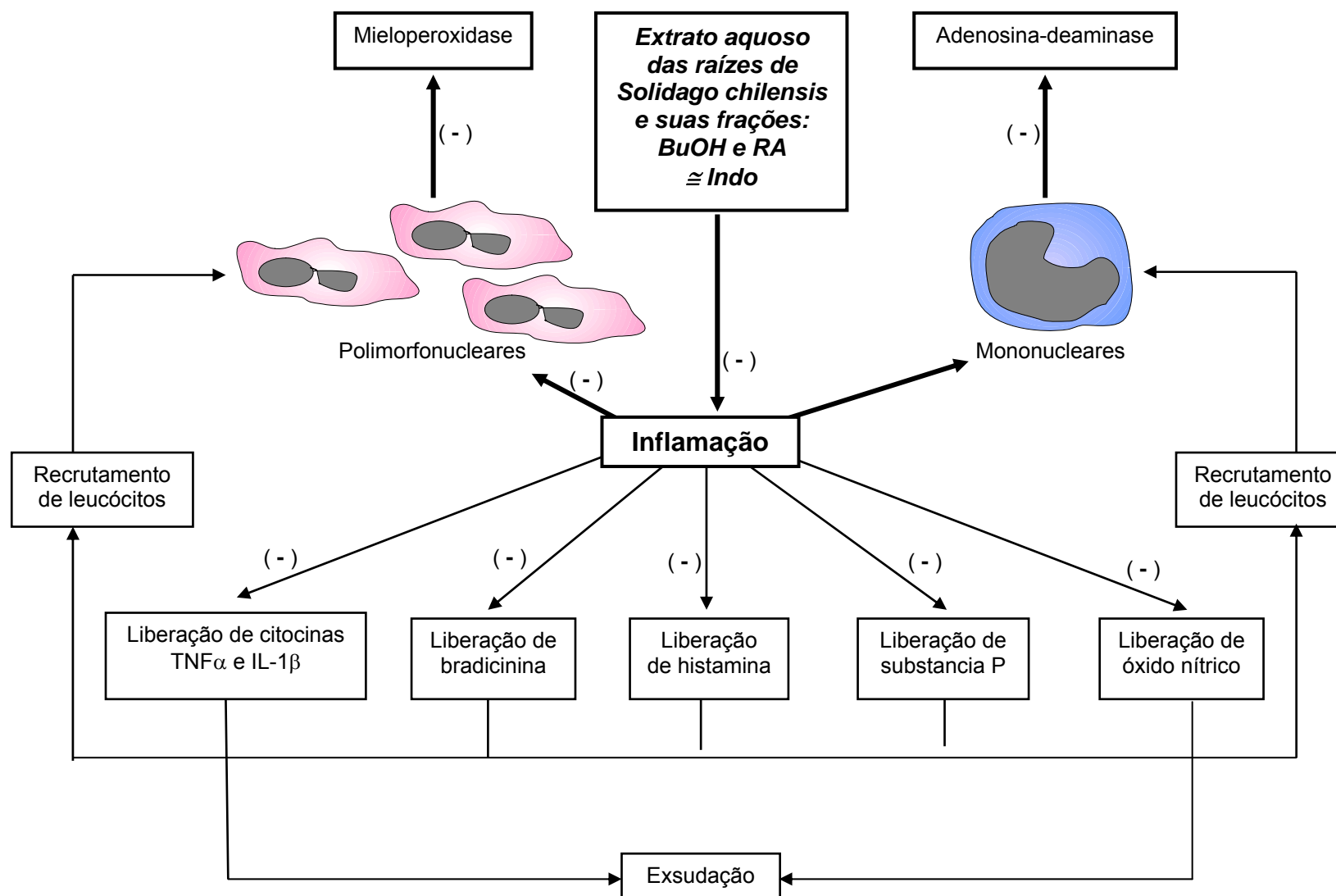


Figura 2: Mecanismo da ação antiinflamatória proposto para o extrato aquoso das raízes de *Solidago chilensis* e suas frações: BuOH e RA.  $\text{TNF}\alpha$ = fator de necrose tumoral alfa;  $\text{IL-1}\beta$ = interleucina 1 beta. (-) = Efeito inibitório da *Solidago chilensis*.



## 6. PERSPECTIVAS

1. Isolar compostos bioativos do extrato aquoso e da fração butanólica das raízes de *Solidago chilensis*, para elucidar as suas estruturas químicas e estudar os seus efeitos antiinflamatórios.
2. Verificar se o efeito antiinflamatório observado é via inibição da expressão de mediadores pró-inflamatórios como  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  e NOSi.
3. Comparar este efeito com aquele observado com fármacos glicocorticóides.

## REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, W.M.; SCURI, M.; FARMER, S.G.. Peptide and non-peptide bradykinin receptor antagonists: role in allergic airway disease. *European Journal of Pharmacology*, v. 533, p. 215-221, 2006.
- AKDIS, C.A.; SIMONS, F.E.. Histamine receptors are hot in immunopharmacology. *European Journal of Pharmacology*, v. 533, p. 69-76, 2006.
- ALBA-LOUREIRO, T.C.; MARTINS, E.F.; MIYASAKA, C.K.; LOPES, L.R.; LANDGRAF, R.G.; JANCAR, S.; CURI, R.; SANNOMIYA, P.. Evidence that arachidonic acid derived from neutrophils and prostaglandin E<sub>2</sub> are associated with the induction of acute lung inflammation by lipopolysaccharide of *Escherichia coli*. *Inflammation Research*, v. 53, p. 658-663, 2004.
- ALDRICH, M.B.; CHEN, W.; BLACKBURN, M.R.; MARTINEZ-VALDEZ, H.; DATTA, S.K.; KELLEMS, R.E.. Impaired germinal center maturation in adenosine deaminase deficiency. *Journal of Immunology*, v. 171, p. 5562-5570, 2003.
- ANTHONSON, T.; McCABE, R.; McCRINDLE, R.; MURRAY, R.D.H.. Constituents of *Solidago* species-I: the constitution and stereochemistry of diterpenoids from *Solidago canadensis* L. *Tetrahedron*, v. 25, p. 2233-2239, 1969.
- ARNHOLD, J.. Properties, functions and secretion of human myeloperoxidase. *Biochemistry*, v. 69, p. 8-15, 2004.
- BAROCELLI, E.; BALLABENI, V.. Histamine in the control of gastric acid secretion: A topic review. *Pharmacological Research*, v. 47, p. 299-304, 2003.
- BATYUK, V.S.; KOL'TSOVA, L.F.. Isoquercitrin – a new flavone glycoside of *Solidago canadensis*. *Khimiya Prirodnykh Soedinenii*, v. 4, p. 381-382, 1968.
- BATYUK, V.S.; KOVALEVA, S.N.. Flavonoids of *Solidago Canadensis* and *Solidago virgaurea*. *Khimiya Prirodnykh Soedinenii*, v. 21, p. 566-567, 1985.
- BIASI, D.; CARLETTO, A.; CARAMASCHI, P.; BONELLA, F.; BAMBARA, V.; PACOR, M.L.; BAMBARA, L.M.. Neutrophils in rheumatoid inflammation. *Recenti Progressi in Medicina*, v. 94, p. 25-30, 2003.
- BLACKBURN, M.R.. Too much of a good thing: Adenosine overload in adenosine-deaminase-deficient mice. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 24, p. 66-70, 2003.
- BLAIS, C.Jr.; MARCEAU, F.; GOULEAU, J.L.; ADAM, A.. The kallikrein-kininogen-kinin system: Lessons from the quantification of endogenous kinins. *Peptides*, v. 21, p. 1903-1940, 2000.
- BLUMENTHAL, M.; BUSSE, W.R.; GOLDBERG, A.. *The complete German Commission E monographs*. Boston: American Botanical Council, Austin and Integrative Medicine Communications, 1998.

BOHLMANN, F.; FRITZ, U.; KING, R.M.; ROBINSON, H.. Sesquiterpene and diterpene derivatives from *Solidago* species. *Phytochemistry*, v. 19, p. 2655-2661, 1980.

BONGARTZ, D.; HESSE, A.. Selective extraction of quercetrin in vegetable drugs and urine by off-line coupling of boronic acid affinity chromatography and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 673, p. 223-230, 1995.

BORGES, A.S.C.. *Efeito do extrato de Solidago microglossa DC sobre a dissolução de coágulos e a hidrólise de N $\mu$ -benzoil-D, L-arginina-para-nitroanilida*. 2001. Dissertação (Mestre em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais.

BORISH, L.C.; STEINKE, J.W.. Cytokines and chemokines. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 111, p. S460-475, 2003.

BOVE, P.F.; VLIET, A.. Nitric oxide and reactive nitrogen species in airway epithelial signaling and inflammation. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 41, p. 515-527, 2006.

BREMER, P.; HEINRICH, M.. Natural products as targeted modulators of the nuclear factor-kappaB pathway. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 54, p. 453-472, 2002.

BUDHU, A.; WANG, X.W.. The role of cytokines in hepatocellular carcinoma. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 80, p. 1-17, 2006.

BUTLER, L.M.; RAINGER, G.D.; RAHMAN, M.; NASH, G.B.. Prolonged culture of endothelial cells and deposition of basement membrane modify the recruitment of neutrophils. *Experimental Cell Research*, v. 310, p. 22-32, 2005.

CAMPOS, M.M.; DE SOUZA, G.E.; RICCI, N.D.; PESQUERO, J.L.; TEIXEIRA, M.M.; CALIXTO, J.B.. The role of migrating leukocytes in IL-1 beta-induced up-regulation of kinin B(1) receptors in rats. *British Journal of Pharmacology*, v. 135, p. 1107-1114, 2002.

CHAN, G.H.H.; FISCUS, R.R.. Exaggerated production of nitric oxide (NO) and increases in inducible NO-synthase mRNA levels induced by the pro-inflammatory cytokine interleukin-1 $\beta$  in vascular smooth muscle cells of elderly rats. *Experimental Gerontology*, v. 39, p. 387-394, 2004.

CHEN, W.; SHIH, C.; LU, W.; LI, P.; CHEN, C.; HAYAKAWA, S.; SHIMIZU, K.; CHIEN, C.. Combination of Wu Lin San and Shan Zha ameliorates substance P-induced hyperactive bladder via the inhibition of neutrophil NADPH oxidase activity. *Neuroscience Letters*, v. 402, p. 7-11, 2006.

CHI, Y.S.; JONG, H.G.; SON, K.H.; CHANG, H.W.; KANG, S.S.; KIM, H.P.. Effects of naturally occurring prenylated flavonoids on enzymes metabolizing arachidonic acid: cyclooxygenases and lipoxygenases. *Biochemical Pharmacology*, v. 62, p. 1185-1191, 2001.

CHRISTMAN, J.W.; SADIKOT, R.T.; BLACKWELL, T.S.. The role of nuclear factor- $\kappa$ B in pulmonare disease. *Chest*, v. 5, p. 1482-1487, 2000.

CHUNG, C.; CHEN, C.; SHEU, J.; CHEN, Y.; CHANG, S.. Proinflammatory cytokines, transforming growth factor- $\beta$ 1, and fibrinolytic enzymes in loculated and free-flowing pleural exudates. *Chest*, v. 128, p. 690-697, 2005.

CHUNN, J.L.; MOLINA, J.G.; MI, T.; XIA, Y.; KELLEMS, R.E.; BLACKBURN, M.R.. Adenosine-dependent pulmonary fibrosis in adenosine deaminase-deficiente mice. *Journal of Immunology*, v. 175, p. 1937-1946, 2005.

CIRINO, C.; FIORUCCI, S.; SESSA, W.C.. Endothelial nitric oxide synthase: The cinderella of inflammation? *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 24, p. 91-95, 2003.

CORSINI, E.; DI PAOLA, R.; VIVIANI, B.; GENOVESE, T.; MAZZON, E.; LUCCHI, L.; MARINOVICH, M.; GALLI, C.L.; CUZZOCREA, S.. Increased carrageenan-induced acute lung inflammation in old rats. *Immunology*, v. 115, p. 253-261, 2005.

COSTA, S.K.P.; YSHII, L.M.; POSTON, R.N.; MUSCARÁ, M.N.; BRAIN, S.D.. Pivotal role of endogenous tachykinins and the NK1 receptor in mediating leukocyte accumulation, in the absence of oedema formation, in response to TNF $\alpha$  in the cutaneous microvasculature. *Journal of Neuroimmunology*, v. 171, p. 99-109, 2006.

CUZZOCREA, S.; MAZZON, E.; CALABRO, G.; DUGO, L.; DE SARRO, A.; VAN DE LOO, F.A.; CAPUTI, A.P.. Inducible nitric oxide synthase-knockout mice exhibit resistance to pleurisy and lung injury caused by carrageenan. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 162, p. 1859-1866, 2000.

CUZZOCREA, S.; NOCENTINI, G.; DI PAOLA, R.; AGOSTINI, M.; MAZZON, E.; RONCHETTI, S.; CRISAFULLI, C.; ESPOSITO, E.; CAPUTI, A.P.; RICCARDI, C.. Proinflammatory role of glucocorticoid-induced TNF receptor-related gene in acute lung inflammation. *The Journal of Immunology*, v. 177, p. 631-641, 2006.

D'ACQUISTO, F.; IANARO, A.; IALENTI, A.; IUVONE, T.; COLANTUONI, V.; CARNACCIO, R.. Activation of nuclear transcription factor  $\kappa$ B in rat carrageenin-induced pleurisy. *European Journal of Pharmacology*, v. 369, p. 233-236, 1999.

DA CUNHA, F.M.; FRÖDE, T.S.; MENDES, G.L.; MALHEIROS, A.; CECHINEL, V.; YUNES, R.; CALIXTO, J.B.. Additional evidence of the anti-inflammatory and anti-allergic properties of the sesquiterpene polygodial. *Life Sciences*, v. 70, p. 159-169, 2001.

DAI, F.; MIAO, Q.; ZHOU, B.; YANG, L.; LIU, Z.. Protective effects of flavonols and their glycosides against free radical-induced oxidative hemolysis of red blood cells. *Life Sciences*, v. 78, p. 2488-2493, 2006.

DAL SECCO, D.; MOREIRA, A.P.; FREITAS, A.; SILVA, J.S.; ROSSI, M.A.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q.. Nitric oxide inhibits neutrophil migration by a mechanism dependent on ICAM-1: role of soluble guanylate cyclase. *Nitric Oxide*, v. 15, p. 77-86, 2006.

DALMARCO, E.M.; FRÖDE, T.S.; MEDEIROS, Y.S.. Additional evidence of acute anti-inflammatory effects of cyclosporin A in a murine model of pleurisy. *Transplant Immunology*, v. 12, p. 151-157, 2004.

DALMARCO, E.M.; FRÖDE, T.S.; MEDEIROS, Y.S.. Effects of methotrexate upon inflammatory parameters induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Mediators of Inflammation*, v. 11, p. 299-306, 2002.

DELGADO, M.; FUENTES, J.A.; FERNÁNDEZ-ALFONSO, M.S.. Histamine up-regulates phosphodiesterase IV activity in U-937 cells through H2 receptor stimulation and cAMP increase. *Medical Science Monitor*, v. 9, p. BR212-219, 2003.

DONALDSON, L.F.; HASKELL, C.A.; HANLEY, M.R.. Messenger RNA localization and further characterisation of the putative tachykinin receptor NK4 (NK3). *Receptors Channels*, v. 7, p. 259-272, 2001.

EARNSHAW, A.. Fotos de algunas de las plantas que se pueden ver en la reserva Ribera Norte. Disponível em: <  
[http://www.geocities.com/riberan/FotosFlores/Solidago\\_chilensis](http://www.geocities.com/riberan/FotosFlores/Solidago_chilensis) > Acesso em: 27 jan. 2005.

EISERICH, J.P.; HRISTOVA, M.; CROSS, C.E.; JONES, A.D.; FREEMAN, B.A.; HALLIWELL, B.; VAN DER VLIET, A.. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature*, v. 391, p. 393-397, 1998.

ENDO, Y.. Induction of histidine decarboxylase in inflammation and immune responses. *Nippon Yakurigaku Zasshi Folia Pharmacologica Japonica*, v. 118, p. 5-14, 2001.

FARMACOPÉIA Brasileira. São Paulo, Brasil: Companhia Editora Nacional, 1929. p. 99-100.

FELTENSTEIN, M.W.; SCHQHLY, W.; WARNICK, J.E.; FISCHER, N.H.; SUFKA, K.J.. Anti-inflammatory and anti-hyperalgesic effects of sesquiterpene lactones from Magnolia and Bear's foot. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 79, p. 299-302, 2004.

FERREIRA, H.H.; LODO, M.L.; MARTINS, A.R.; KANDRATAVICIUS, L.; SALAROLI, A.F.; CONRAN, N.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G.. Expression of nitric oxide synthases and *in vitro* migration of eosinophils from allergic rhinitis subjects. *European Journal of Pharmacology*, v. 442, p. 155-162, 2002a.

FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M.; ARAUJO, R.; BADER, M.; PESQUERO, J.B.; CALIXTO, J.B.. The use of kinin B1 and B2 receptor knockout mice and selective antagonists to characterize the nociceptive responses caused by kinins at the spinal level. *Neuropharmacology*, v. 43, p. 1188-1197, 2002b.

FRANÇA, S.C.. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas In: *Farmacognosia da Planta ao medicamento*. SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL E.P.; GOSMANN G.; DE MELLO J.C.P.; MENTZ L.A.; PETROVICK P.R. (eds). Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade/UFRGS/ Editora UFSC/ Brasil, 2003. p. 123-146.

FRANCO-PENTEADO, C.F.; DESOUSA, I.; TEIXEIRA, S.A.; RIBEIRO-DA SILVA, G.; NUCCI, G.; ANTUNES, E.. Role of nitric oxide on the increased vascular permeability and neutrophil accumulation induced by staphylococcal enterotoxin B into the mouse paw. *Biochemical Pharmacology*, v. 61, p. 1305-1311, 2001.

FREISE, H.; PALMES, D.; SPIEGEL, H.. Inhibition of angiotensin-converting enzyme reduces rat liver reperfusion injury via bradykinin-2-receptor. *Journal of Surgical Research*, v. 134, p. 231-237, 2006.

FRÖDE, T.S.; MEDEIROS, Y.S.. Myeloperoxidase and adenosine-deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Mediators of Inflammation*, v. 10, p. 223-227, 2001.

FRÖDE, T.S.; SOUZA, G.E.; CALIXTO, J.B.. The effects of IL-6 and IL-10 and their specific antibodies in the acute inflammatory response induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Cytokine*, v. 17, p. 149-156, 2002.

FRÖDE, T.S.; SOUZA, G.E.; CALIXTO, J.B.. The modulatory role played by TNF- $\alpha$  and IL-1  $\beta$  in the inflammatory responses induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Cytokine*, v. 13, p. 162-168, 2001.

GAMA LANDGRAF, R.G.; STEIL, A.A.; SIROIS, P.; JANCAR, S.. Modulation of allergic and immune complex-induced lung inflammation by bradykinin receptor antagonists. *Inflammation Research*, v. 53, p. 78-83, 2004.

GINES, S.; MARINO, M.; MALLOL, J.; CANELA, E.I.; MORIMOTO, C.; CALLEBAUT, C.; HOVANESSIAN, A.; CASADO, V.; LLUIS, C.; FRANCO, R.. Regulation of epithelial and lymphocyte cell adhesion by adenosine deaminase-CD26 interaction. *Biochemical Journal*, v. 361, p. 203-209, 2002.

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O.. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos In: *Farmacognosia da Planta ao medicamento*. SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL E.P., GOSMANN G.; DE MELLO J.C.P.; MENTZ L.A.; PETROVICK P.R. (eds). Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade/UFRGS/ Editora UFSC/ Brasil, 2003. p. 13-28.

GÜNTNER, C.; BARRA, C.; CESIO, M.V.; DELLACASSA, E.; FERNANDO, L.; FERREIRA, F.; GARCÍA, G.; GONZÁLEZ, G.; HEINZEN, H.; LLORET, A.; LORENZO, D.; MENÉNDEZ, P.; PAZ, D.; SOULE, S.; VÁZQUEZ, A.; MOYNA, P.. Antioxidant properties of *Solidago chilensis* L. flavonoids. *Acta Horticulturae*, v. 501, p. 159-162, 1999.

HÄNSEL, R.; KELLER, K.; RIMPLER, H.; SCHEIDER, G. (eds). *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis*. Berlin: Springer, 1994. p. 752-764.

HANSSON, M.; OLSSON, I.; NAUSEEF, W.M.. Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 445, p. 214-224, 2006.

HARRISON, S.; GEPPETTI, P.. Substance P. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 33, p. 555-576, 2001.

HASHIMOTO, T.; OHATA, H.; HONDA, H.. Lysophosphatidic acid (LPA) induces plasma exudation and histamine release in mice via LPA receptors. *Journal of Pharmacological Sciences*, v. 100, p. 82-87, 2006.

HEHNER, S.P.; HOFMANN, T.G.; DROGE, W.; SCHMITZ, M.L.. The antiinflammatory sesquiterpene lactone parthenolide inhibits NF-kappa B by targeting the I kappa B kinase complex. *Journal of Immunology*, v. 163, p. 5617-5623, 1999.

HEMMRICH, K.; KRÖNCKE, K.; SUSCHEK, C.V.; KOLB-BACHOFEN, V.. What sense lies in antisense inhibition of inducible nitric oxide synthase expression? *Nitric Oxide*, v. 12, p. 183-199, 2005.

HUANG, Q.; SHAO, L.; HE, M.; CHEN, H.; LIU, D.; LUO, Y.; DAI, Y.. Inhibitory effects of sasanquasaponin on over-expression of ICAM-1 and on enhancement of capillary permeability induced by burns in rats. *Burns*, v. 31, p. 637-642, 2005.

JIANG, M.; TSUKAHARA, H.; HAYAKAWA, K.; TODOROKI, Y.; TAMURA, S.; OHSHIMA, Y.; HIRAOKA, M.; MAYUMI, M.. Effects of antioxidants and NO on TNF- $\alpha$ -induced adhesion molecule expression in human pulmonary microvascular endothelial cells. *Respiratory Medicine*, v. 99, p. 580-591, 2005.

JIMENEZ-ESTRADA, M.; CHILPA, R.R.; APAN, T.R.; LLEDIAS, F.; HANSBERG, W.; ARRIETA, D.; AGUILAR, F.J.A.. Anti-inflammatory activity of cacalol and cacalone sesquiterpenes isolated from *Psacalium decompositum*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 105, p. 34-38, 2006.

JUTEL, M.; BLASER, K.; AKDIS, C.A.. Histamine in allergic inflammation and immune modulation. *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology*, v. 137, p. 82-92, 2005.

KANG, J.; SUNG, M.; KAWADA, T.; YOO, H.; KIM, Y.; KIM, J.; YU, R.. Soybean saponins suppress the release of proinflammatory mediators by LPS-stimulated peritoneal macrophages. *Cancer Letters*, v. 230, p. 219-227, 2005.

KAWANO, T.; MATSUSE, H.; KONDO, Y.; MACHIDA, I.; SAEKI, S.; TOMARI, S.; MITSUTA, K.; OBASE, Y.; FUKUSHIMA, C.; SHIMODA, T.; KOHNO, S.. Acetaldehyde induces histamine release from human airway mast cells to cause bronchoconstriction. *International Archives of Allergy and Immunology*, v. 134, p. 233-239, 2004.

KIM, H.S.; KIM, W.D.; LEE, Y.H.. Production and expression of gro- $\alpha$  and RANTES by peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with Kawasaki disease and measles. *Journal of Korean Medical Science*, v. 18, p. 381-386, 2003.

KIM, J.Y.; HWANG, Y.P.; KIM, D.H.; HAN, E.H.; CHUNG, Y.C.; ROH, S.H.; JEONG, H.G.. Inhibitory Effect of the saponins derived from roots of *Platycodon grandiflorum* on carrageenan-induced inflammation. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 70, p. 858-864, 2006b.

KIM, J.Y.; KIM, D.H.; KIM, H.G.; SONG, G.; CHUNG, Y.C.; ROH, S.H.; JEONG, H.G.. Inhibition of tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced expression of adhesion molecules

in human endothelial cells by the saponins derived from roots of *Platycodon grandiflorum*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 210, p. 150-156, 2006a.

KINHULT, J.; EGESTEN, A.; BENSON, M.; UDDMAN, R.; CARDELL, L.O.. Increased expression of surface activation markers on neutrophils following migration into the nasal lumen. *Clinical and Experimental Allergy*, v. 33, p. 1141-1146, 2003.

KLEBANOFF, S.J.. Myeloperoxidase: friend ou foe. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 77, p. 1-28, 2005.

KREPINSKY, J.; HEROUT, V.. Plant substances. XVIII. Isolation of terpenic compounds from *Solidago canadensis*. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, v. 27, p. 2459-2462, 1962.

KUNO, M.; SEKI, N.; TSUJIMOTO, S.; NAKANISHI, I.; KINOSHITA, T.; NAKAMURA, K.; TERASAKA, T.; NISHIO, N.; SATO, A.; FUJII, T.. Anti-inflammatory activity of non-nucleoside adenosine deaminase inhibitor FR234938. *European Journal of Pharmacology*, v. 534, p. 241-249, 2006.

LAU, D.; MOLLNAU, H.; EISERICH, J.P.; FREEMAN, B.A.; DAIBER, A.; GEHLING, U.M.; BRÜMMER, J.; RUDOLPH, V.; MÜNDEL, T.; HEITZER, T.; MEINERTZ, T.; BALDUS, S.. Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 102, p. 431-436, 2005.

LIU, L.; BURCHER, E.. Tachykinin peptides and receptors: Putting amphibians into perspective. *Peptides*, v. 26, p. 1369-1382, 2005.

LIVINGSTON, M.; HEANEY, L.G.; ENNIS, M.. Adenosine, inflammation and asthma – a review. *Inflammation Research*, v. 53, p. 171-178, 2004.

LORENZI, H., MATOS, F.J.A.. *Solidago chilensis* Meyen. In: *Plantas Medicinais no Brasil – nativas e exóticas*. LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. (eds). São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002. p. 170-171.

LU, T.; MENELAOU, M.A.; VARGAS, D.; FRONCZEK, F.R.; FISCHER, N.K.. Polyacetylenes and diterpenes from *Solidago canadensis*. *Phytochemistry*, v. 32, p. 1483-1488, 1993.

MacGLASHAN, D. Jr.. Histamine: A mediator of inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 112, p. S53-S59, 2003.

MARONE, G.; GRANATA, F.; SPADARO, G.; GENOVESE, A.; TRIGGIANI, M.. The histamine-cytokine network in allergic inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 112, p. S83-S88, 2003.

MEDEIROS, R.; CABRINI, D.A.; FERREIRA, J.; FERNANDES, E.S.; MORI, M.A.; PESQUERO, J.B.; BADER, M.; AVELLAR, M.C.; CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B.. Bradykinin B1 receptor expression induced by tissue damage in the rat portal vein. A critical role for mitogen-activated protein kinase and nuclear factor- $\kappa$ B signaling pathways. *Circulation Research*, v. 94, p. 1375-1382, 2004.



- MENEGAZZI, M.; DI PAOLA, R.; MAZZON, E.; MUIÀ, C.; GENOVESE, T.; CRISAFULLI, C.; SUZUKI, H.; CUZZOCREA, S.. *Hypericum perforatum* attenuates the development of carrageenan-induced lung injury in mice. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 40, p. 740-753, 2006.
- MERFORT, I.. Arnica: new insights on the molecular mode of action of a traditional medicinal plant. *Forschende Komplementärmedizin und Klassische Naturheilkunde*, v. 1, p. 45-48, 2003.
- MOLLER, B.; VILLIGER, P.M.. Inhibition of IL-1, IL-6, and TNF- $\alpha$  in immune-mediated inflammatory diseases. *Springer Seminars in Immunopathology*, v. 27, p. 391-408, 2006.
- MORIOKA, N.; INOUE, A.; HANADA, T.; KUMAGAI, K.; TAKEDA, K.; IKOMA, K.; HIDE, I.; TAMURA, Y.; SHIOMI, H.; DOHI, T.; NAKATA, Y.. Nitric oxide synergistically potentiates interleukin-1 beta-induced increase of cyclooxygenase-2 mRNA levels, resulting in the facilitation of substance P release from primary afferent neurons: involvement of cGMP-independent mechanisms. *Neuropharmacology*, v. 43, p. 868-876, 2002.
- MUHL, H.; DINARELLO, C. A.. Macrophage inflammatory protein-1  $\alpha$  production in lipopolysaccharide-stimulated human adherent blood mononuclear cells is inhibited by the nitric oxide synthase inhibitor N(G)-monomethyl-L-arginine. *Journal of Immunology*, v. 159, p. 5063-5069, 1997.
- MULLER-LADNER, U.; PAP, T.; GAY, R.E.; NEIDHART, M.; GAY, S.. Mechanisms of disease: the molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Nature Clinical Practice Rheumatology*, v. 1, p. 102-110, 2005.
- NAIR, M.P.; MAHAJAN, S.; REYNOLDS, J.L.; AALINKEEL, R.; NAIR, H.; SCHWARTZ, S.A.; KANDASWAMI, C.. The flavonoid quercetin inhibits proinflammatory cytokine (tumor necrosis factor  $\alpha$ ) gene expression in normal peripheral blood mononuclear cells via modulation of the NF- $\kappa$ B system. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 13, p. 319-328, 2006.
- NAKAMACHI, Y.; KOSHIBA, M.; NAKAZAWA, T.; HATACHI, S.; SAURA, R.; KUROSACA, M.; KUSAKA, H.; KUMAGAI, S.. Specific increase in enzymatic activity of adenosine deaminase 1 in rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis & Rheumatism*, v. 48, p. 668-674, 2003.
- NEVE, J.; PARIJ, N.; MOGUILEVSKY, N.. Inhibition of the myeloperoxidase chlorinating activity by non-steroidal anti-inflammatory drugs investigated with a human recombinant enzyme. *European Journal of Pharmacology*, v. 417, p. 37-43, 2001.
- NGOC, L.P.; GOLD, D.R.; TZIANABOS, A.O.; WEISS, S.T.; CELEDÓN, J.C.. Cytokines, allergy, and asthma. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, v. 5, p. 161-166, 2005.
- O'CONNOR, T.M.; O'CONNELL, J.; O'BRIEN, D.I.; GOODE, T.; BREDIN, C.P.; SHANAHAN, F.. The role of substance P in inflammatory disease. *Journal of Cellular Physiology*, v. 201, p. 167-180, 2004.

O'SHAUGHNESSY, M.C.; VETSIKA, E.K.; INGLIS, J.J.; CARLESON, J.; HAIGH, R.; KIDD, B.L.; WINYARD, P.G.. The effect of substance P on nitric oxide release in a rheumatoid arthritis model. *Inflammation Research*, v. 55, p. 236-240, 2006.

PASSOS, G.F.; FERNANDES, E.S.; CAMPOS, M.M.; ARAÚJO, J.G.V.C.; PESQUERO, J.L.; SOUZA, G.E.P.; AVELLAR, M.C.W.; TEIXEIRA, M.M.; CALIXTO, J.B.. Kinin B1 receptor up-regulation after lipopolysaccharide administration: role of proinflammatory cytokines and neutrophil influx. *The Journal of Immunology*, v. 172, p. 1839-1847, 2004.

PELZER, L.E.; GUARDIA, T.; OSVALDO JUAREZ, A.; GUERREIRO, E.. Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. *IL Fármaco*, v. 53, p. 421-424, 1998.

PENNEFATHER, J.N.; LECCI, A.; CANDENAS, M.I.; PATAK, E.; PINTO, F.M.; MAGGI, C.A.. Tachykinins and tachykinin receptors: A growing family. *Life Sciences*, v. 74, p. 1445-1463, 2004.

PERGOLA, C.; ROSSI, A.; DUGO, P.; CUZZOCREA, S.; SAUTEBIN, L.. Inhibition of nitric oxide biosynthesis by anthocyanin fraction of blackberry extract. *Nitric Oxide*, v. 15, p. 30-39, 2006.

PETTERSEN, C.A.; ADLER, K.B.. Airways inflammation and COPD. *Chest*, v. 121, p. 142S-150S, 2002.

PRADO, C.M.; LEICK-MALDONADO, E.A.; YANO, L.; LEME, A.S.; CAPELOZZI, V.L.; MARTINS, M.A.; TIBERIO, I.F.. Effects of nitric oxide synthases in chronic allergic airway inflammation and remodeling. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 35, p. 457-465, 2006.

RATES, S.M.K.. Plants as source of drugs. *Toxicon*, v. 39, p. 603-613, 2001.

REGOLI, D.; BARABE, J.. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacological Reviews*, v. 32, p. 1-46, 1980.

REYNOLDS, W.F.; STEGEMAN, C.A.; TERVAERT, J.W.C.. -463 G/A Myeloperoxidase promoter polymorphism is associated with clinical manifestations and the course of disease in MPO-ANCA-associated vasculitis. *Clinical Immunology*, v. 103, p. 154-160, 2002.

REZNICEK, G.; JURENITSCH, J.; HASLINGER, E.. The first structurally confirmed saponin from *Solidago gigantea*: structure elucidation by modern NMR techniques. *Tetrahedron Letters*, v. 30, p. 4097-4100, 1989.

REZNICEK, G.; JURENITSCH, J.; PLASUN, M.; KORHAMMER, S.; HASLINGER, E.; HILLER, K.; KUBELKA, W.. Four major saponins from *Solidago canadensis*. *Phytochemistry*, v. 30, p. 1629-1633, 1991.

RICCIARDOLO, F.L.M.. Multiple roles of nitric oxide in the airways. *Thorax*, v. 58, p. 175-182, 2003.

RICCIARDOLO, F.L.M.; STERK, P.J.; GASTON, B.; FOLKERTS, G.. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiological Reviews*, v. 84, p. 731-765, 2004.

RODRIGUES, M.R.; RODRIGUEZ, D.; RUSSO, M.; CAMPA, A.. Macrophage activation includes high intracellular myeloperoxidase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 292, p. 869-873, 2002.

ROUZAUT, A.; SUBIRA, M.L.; DE MIGUEL, C.; DOMINGO-DE-MIGUEL, E.; GONZALEZ, A.; SANTIAGO, E.; LOPEZ-MORATALLA, N.. Co-expression of inducible nitric oxide synthase and arginases in different human monocyte subsets. Apoptosis regulated by endogenous NO. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1451, p. 319-333, 1999.

SALEH, T.S.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S.. Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. *British Journal of Pharmacology*, v. 118, p. 811-819, 1996.

SALEH, T.S.F.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S.. Effects of antiinflammatory drugs upon nitrate and myeloperoxidase levels in the mouse pleurisy induced by carrageenan. *Peptides*, v. 20, p. 949-956, 1999.

SALEH, T.S.F.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S.. Pro-inflammatory effects induced by bradykinin in a murine model of pleurisy. *European Journal of Pharmacology*, v. 331, p. 43-52, 1997.

SANTOS, D.R.; CALIXTO, J.B.; SOUZA, G.E.. Effect of a kinin B2 receptor antagonist on LPS- and cytokine-induced neutrophil migration in rats. *British Journal of Pharmacology*, v. 139, p. 271-278, 2003.

SANTOS, J.M.M.; TATSUO, M.A.K.F.; TURCHETTI-MAIA, M.A.K.F.; LISBOA, M.C.G.; FRANCISCHI, J.N.. Leukocyte recruitment to peritoneal cavity of rats following formalin injection: role of tachykinin receptors. *Journal of Pharmacological Sciences*, v. 94, p. 384-392, 2004.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R.. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos In: *Farmacognosia da Planta ao medicamento*. SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL E.P.; GOSMANN G.; DE MELLO J.C.P.; MENTZ L.A.; PETROVICK P.R. (eds). Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade/ UFRGS/ Editora UFSC/ Brasil, 2003. p. 371-400.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.. A labdan diterpene from *Solidago chilensis* Roots. *Planta Medica*, v. 2, p. 179-180, 1987.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; RODRIGUEZ, J.; ASTUDILLO, L.. Gastroprotective activity of the diterpene solidagenone and its derivatives on experimentally induced gastric lesions in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 81, p. 111-115, 2002.

SCHMID-SCHÖNBEIN, G.W.. Analysis of Inflammation. *Annual Review of Biomedical Engineering*, v. 8, p. 93-151, 2006.

SEDGWICK, A.D.; WILLOUGHBY, D.A.. Initiation of inflammatory response and its prevention. In: *Handbook of inflammation*. BONTA, I.L.; BRAY, M.A.; PARNHAM, M.J. (eds). New York: Elsevier, 1985. p. 27-47.

SIEDLE, B.; GARCIA-PINERES, A.J.; MURILLO, R.; SCHULTE-MONTING, J.; CASTRO, V.; RUNGELER, P.; KLAAS, C.A.; DA COSTA, F.B.; KISIEL, W.; MERFORT, I.. Quantitative structure-activity relationship of sesquiterpene lactones as inhibitors of the transcription factor NF-kappaB. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 47, p. 6042-6054, 2004.

SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; IRGANG, B.E.; STEHMANN, J.R. (eds). *Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul*. Porto Alegre: Editora da Universidade/UFRGS, 1998. p. 68-69.

SINGBARTL, K.; GREEN, S.A.; LEY, K.. Blocking P-selectin protects from ischemia/reperfusion-induced acute renal failure. *FASEB Journal*, v. 14, p. 48-54, 2000.

SOMMER, C.; KRESS, M.. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. *Neurosciences Letters*, v. 361, p. 184-187, 2004.

SPICUZZA, L.; DI MARIA, G.; POLOSA, R.. Adenosine in the airways: implications and applications. *European Journal of Pharmacology*, v. 533, p. 77-86, 2006.

SZELENYI, I.; BRUME, K.. Herbal remedies for asthma treatment: between myth and reality. *Drugs Today*, v. 38, p. 265-303, 2002.

TAKANO-ISHIKAWA, Y.; GOTO, M.; YAMAKI, K.. Inhibitory effects of several flavonoids on E-selectin expression on human umbilical vein endothelial cells stimulated by tumor necrosis factor-alpha. *Phytotherapy Research*, v. 17, p. 1224-1227, 2003.

TAKEUCHI, K.; WATANABE, H.; TRAN, Q.; OZEKI, M.; SUMI, D.; HAYASHI, T.; IGUCHI, A.; IGNARRO, L.J.; OHASHI, K.; HAYASHI, H.. Nitric oxide: inhibitory effects on endothelial cells calcium signaling, prostaglandin I<sub>2</sub> production and nitric oxide synthase expression. *Cardiovascular Research*, v. 62, p. 194-201, 2004.

THIEM, B.; GOSLINSKA, O.. Antimicrobial activity of *Solidago virgaurea* L. from in vitro cultures. *Fitoterapia*, v. 73, p. 514-516, 2002.

TORRES, L.M.B.; AKISUE, M.K.; ROQUE, N.F.. Quercitrina em *Solidago microglossa* DC, a arnica do Brasil. *Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo*, v. 23, p. 33-40, 1987.

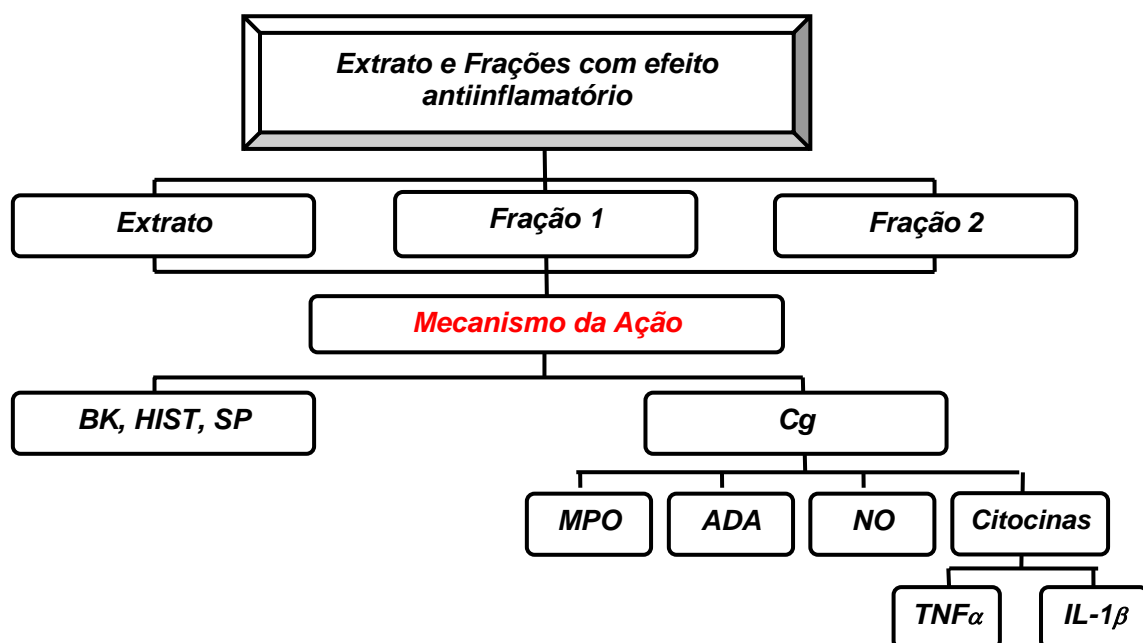
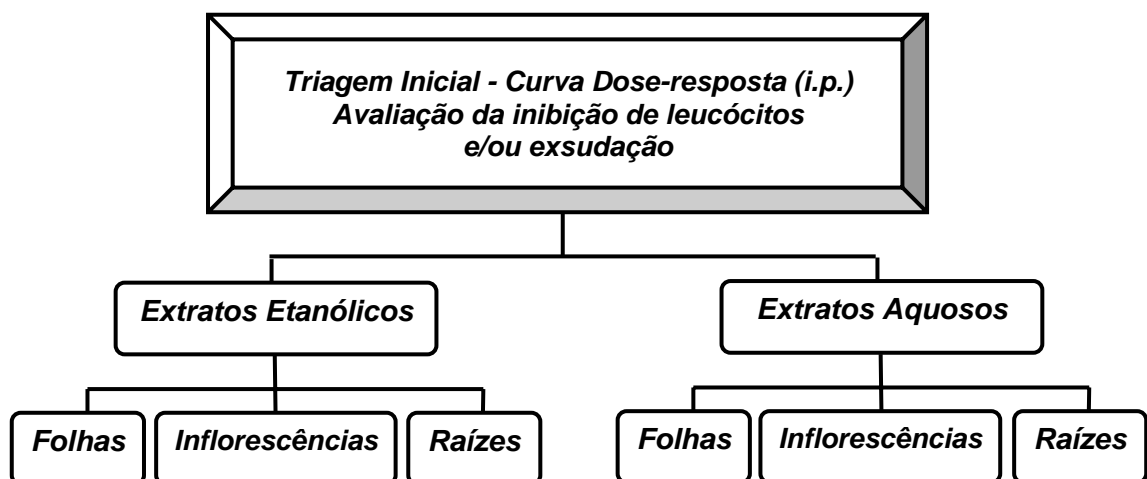
UEDA, H.; YAMAZAKI, C.; YAMAZAKI, M.. A hydroxyl group of flavonoids affects oral anti-inflammatory activity and inhibition of systemic tumor necrosis factor-alpha production. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 68, p. 119-125, 2004.

VILA, R.; MUNDINA, M.; TOMI, F.; FURLAN, R.; ZACCHINO, S.; CASANOVA, J.; CANIGUERAL, S.. Composition and antifungal activity of the essential oil of *Solidago chilensis*. *Planta Medica*, v. 68, p. 164-167, 2002.

- WANG, L.; UNEHARA, T.; KITANAKA, S.. Anti-inflammatory activity of new guaiane type sesquiterpene from *Wikstroemia indica*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 53, p. 137-139, 2005.
- WEYERSTAHL, P.; MARSCHALL, H.; CHRISTIANSEN, C.; KALEMBA, D.; GÓRA, J.. Constituents of the essential oil of *Solidago canadensis* ("Goldenrod") from Poland- A correction. *Planta Medica Letters*, v. 59, p. 281-282, 1993.
- WONG, M.M.; FISH, E.M.. Chemokines: Attractive mediators of the immune response. *Seminars in Immunology*, v. 15, p. 5-14, 2003.
- WOTHERSPOON, F.; BROWNE, D.L.; MEEKING, D.R.; ALLARD, S.E.; MUNDAY, L.J.; SHAM, K.M.; CUMMINGS, M.H.. The contribution of nitric oxide and vasodilatory prostanoids to bradykinin-mediated vasodilation in tpe 1 diabetes. *Diabetic Medicine*, v. 22, p. 697-702, 2005.
- YOUNG, H.W.J.; MOLINA, J.G.; DIMINA, D.; ZHONG, H.; JACOBSON, M.; CHAN, L.L.; CHAN, T.; LEE, J.J.; BLACKBURN, M.R.. A<sub>3</sub> adenosine receptor signaling contributes to airway inflammation and mucus production in adenosine deaminase-deficient mice. *The Journal of Immunology*, v. 173, p. 1380-1389, 2004.
- YOUSIF, M.H.M.. Histamine-induced vasodilation in the perfused kidney of STZ-diabetic rats: role of EDNO and EDHF. *Pharmacological Research*, v. 51, p. 515-521, 2005.
- YUN, P.L.W.; DECARLO, A.A.; HUNTER, N.. Gingipains of *Porphyromonas gingivalis* modulate leukocyte adhesion molecule expression induced in human endothelial cells by ligation of CD99. *Infection and Immunity*, v. 74, p. 1661-1672, 2006.
- ZHANG, Y.; ADNER, M.; CARDELL, L.O.. Glucocorticoids suppress transcriptional up-regulation of bradykinin receptors in a murine in vitro model of chronic airway inflammation. *Clinical and Experimental Allergy*, v. 35, p. 531-538, 2005.
- ZINGARELLI, B.; SHEEHAN, M.; WONG, H.R.. Nuclear factor-κB as a therapeutic target in critical care medicine. *Critical Care Medicine*, v. 31, p. 105-111, 2003.

**ANEXO 1**

**Organogramas da triagem dos extratos e do mecanismo da ação  
antiinflamatória dos extratos e frações**



## **ANEXO 2**

### **Protocolo e cadastro da Comissão de Ética no Uso de Animais**